

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA EM HORTALIÇAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS COMERCIALIZADAS EM
PORTO ALEGRE - RS**

Silvia Regina Pavan da Silva
Bióloga

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA EM HORTALIÇAS
MINIMAMENTE PROCESSADAS COMERCIALIZADAS EM
PORTO ALEGRE - RS**

Silvia Regina Pavan da Silva
Bióloga – PUC-RS

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
na área de Microbiologia dos Alimentos
Orientador: Gertrudes Corção
Co-orientador: Marilise Brittes Rott

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Abril, 2006

DEDICO,

Aos meus pais, exemplos de amor e luta, em especial minha mãe "*in memoriam*", pela mulher maravilhosa, guerreira e incansável em todos momentos.

Aos meus filhos, pelos momentos que abdiquei de suas companhias para tocar este trabalho.

Ao meu marido Alicio, pelo apoio e estímulo constantes na minha realização profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência, fé e coragem.

À Dra. Gertrudes Corção pela orientação, confiança, oportunidades de conhecimento e crescimento profissional.

À Dra. Marilise B. Rott pela co-orientação, sugestões e inestimável ajuda.

Ao Depto de Microbiologia e ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da UFRGS pela oportunidade da realização do curso.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia: Prof. Kanan pela estímulo, desde o começo de tudo e colaboração em muitos momentos. Prof. Carlos, pela ajuda na estatística, nas tabelas e pelo apoio sempre que precisei. Profa. Márcia, Profa. Neusa e Profa. Marillise pela convivência, amizade e força. À colega Roberta, à bolsista Paola pelo auxílio nas atividades do laboratório.

À colega Sylvia, pela ajuda, amizade e pelo dom de manter um ambiente de alegria no laboratório.

À colega de trabalho Sayonara, pelo auxílio, pela amizade e pelo apoio emocional.

À bolsista Dariane, pela ajuda nos momentos mais difíceis e pela amizade que nasceu durante esta caminhada .

Às colegas de curso Katiane, Rosane, Juliana, Cristina, Ana Beatriz, Ana Maris e Sylvia pela amizade e pelo grande apoio de todas. Também à bolsita Aline e ao pessoal do laboratório de Microbiologia por toda força e auxílio.

Aos familiares e amigos, que muitos mesmo sem conhecerem ao certo meu trabalho me deram muita força, pois sabiam da importância para mim, inclusive a Bia.

À todos,
meu muito obrigada!

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA EM HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS COMERCIALIZADAS EM PORTO ALEGRE - RS¹.

Autor: Silvia Regina Pavan da Silva
Orientadora: Profa. Dr^a Gertrudes Corção
Co-orientadora: Profa. Dr^a Marilise Brittes Rott

RESUMO

Vegetais minimamente processados passam por algumas etapas durante seu preparo, ocorrem modificações na sua forma natural, porém devem manter a qualidade do produto fresco. Este estudo teve como objetivo quantificar mesófilos e psicrotróficos, coliformes totais e fecais, e verificar a presença de *Escherichia coli*, parasitos e sujidades em hortaliças prontas para o consumo. Foi utilizado o método de contagem em placas (UFC/g), para mesófilos e psicrotróficos. A contagem dos coliformes foi pelo método do Número Mais Provável (NMP). *E. coli* foi confirmada em meio EMB e provas bioquímicas. Para pesquisa de enteroparasitos, as hortaliças foram lavadas e o sedimento analisado pelos métodos de Faust e Lutz. As sujidades foram investigadas por filtração e observação em estereomicroscópio. A análise de mesófilos e psicrotróficos foi mensal, realizada em 48 amostras, variando entre 5,68 a 8,21 log₁₀ UFC/g e entre 6,90 a 8,44 log₁₀ UFC/g respectivamente. Destas, 24 foram analisadas para coliformes, onde as contagens de totais foram de <0,47 a 4,38 log₁₀ NMP/g e de fecais de <0,47 a 3,66 log₁₀ NMP/g. Quatro (16,6%) amostras apresentaram índices acima do permitido pela legislação. *E coli* foi observada em 6 amostras de coliformes fecais. Das 48 amostras utilizadas nas análises parasitológicas, cinco (10,4%) foram positivas para oocistos de *Eimeria* spp. A maioria das amostras apresentou algum tipo de sujidades. Contaminação de origem fecal foi verificada, sugerindo falhas nas etapas do processamento ou sanificação das hortaliças, além de indicar que o solo ou águas de irrigação possam constituir possíveis fontes desses microrganismos.

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS. Brasil (75 p.) Abril de 2005.

BACTERIOLOGIC AND PARASITOLOGICAL EVALUATION OF MINIMALLY PROCESSED VEGETABLES COMMERCIALIZED IN PORTO ALEGRE – RS.

Author : Silvia Regina Pavan da Silva
Supervisor : Profa Dr Gertrudes Corção
Supervisor : Profa Dr Marilise Brittes Rott

Abstract

Minimally processed vegetables go through some steps during preparation where many modifications in their natural structure occur, however they have to keep the same quality as the fresh product. The aim of the present study was to quantify mesophiles and psychrotrophs microorganisms, total and faecal coliforms and to verify the presence of *Escherichia coli*, parasites and dirt material in ready to eat minimally processed vegetables. For mesophiles and psychrotrophs, total counting in agar plates were done. Total and faecal coliforms counting were by the most probable number method. The presence of *E. coli* was confirmed on EMB agar and biochemical tests. For the enteroparasites search, the vegetables were washed and the precipitate was analyzed by Faust and Lutz method. The dirt material was investigated by filtration and observation at stereomicroscopic. Mesophiles and psychrotrophs were analyzed monthly and realized in 48 samples. The counting varies from 5.68 to 8.21 log₁₀ UFC/g and from 6.90 to 8.44 log₁₀ UFC/g, respectively. Twenty four samples were analyzed to the coliform group, the counting for the total ones was from <0.47 to 4.38 log₁₀ NMP/g and to the faecal ones, was from <0.47 to 3.66 log₁₀ NMP/g. Four samples (16.60%) showed indexes above the ones tolerated by the national legislation. *E. coli* was observed in 6 of the samples for faecal coliforms. Forty eight samples were analyzed for the presence of enteroparasites and five (10.41%) were positive for *Eimeria* spp. oocysts. Most of the samples presented some dirty material. Contamination of faecal origin was verified, this finding suggested failures at the processing or at the sanitization steps and this also indicated that the soil or the irrigation water could be the main source of these microorganisms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLOGRÁFICA	5
2.1. Produtos minimamente processados.....	5
2.2. Microbiota normal e patógenos encontrados em hortaliças.....	8
2.3. Parasitos presentes em hortaliças	12
2.4. Surto de doenças transmitidas por alimentos (DTA).....	18
2.5. Qualidade microbiológica e condições higiênico-sanitárias em hortaliças.....	20
2.5.1. Indicadores de contaminação.....	23
2.5.2. Legislação.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Amostragem.....	29
3.2. Preparo das amostras.....	30
3.3. Análises Microbiológicas.....	31
3.3.1. Contagem total de mesófilos.....	31
3.3.2. Contagem total de psicotróficos.....	32
3.3.3. Número mais provável de coliformes totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> (NMP).....	32
3.4. Análise parasitológica.....	35
3.5. Análise de sujidades por filtração.....	35
3.6. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Análises microbiológicas das hortaliças minimamente processadas.....	37
4.1.1. Contagem de microrganismos mesófilos e psicotróficos.....	37
4.1.2. Contagem de coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i>	44
4.2. Análises parasitológicas das hortaliças minimamente processadas.....	50
4.3. Análise de sujidades das hortaliças minimamente processadas.....	57
5. CONCLUSÕES.....	60
6. PERSPECTIVAS.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. APÊNDICES.....	70
8.1. Resultados da contagem de mesófilos e psicotróficos (UFC/g) Log ₁₀ nas hortaliças minimamente processadas comercializadas em POA-RS.....	71
8.2. Resultados dos níveis de coliformes totais (CT), coliformes fecais (CF) e <i>Escherichia coli</i> (NMP/g) em Log ₁₀ nas hortaliças MP	72

8.3. Resultados da análise parasitológica e de sujidades das hortaliças MP comercializadas em Porto Alegre-RS no período de setembro de 2004 a agosto de 2005.....	73
8.4. Caldo VM/VP.....	74
8.5. Cloreto de Sódio (0,9%).....	74
8.6. Solução Detergente (0,5%).....	74
8.7. Sulfato de Zinco (d=1,182g/mL).....	75

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1	Média da contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos em hortaliças minimamente processadas, comercializadas em Porto Alegre-RS, durante as quatro estações do ano O período foi de setembro de 2004 a agosto de 2005. Os valores estão representados em \log_{10} UFC/g.....	43
TABELA 2	Frequência relativa (%) da sazonalidade em relação à presença de parasitos em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Porto Alegre-RS, no período de setembro de 2004 a agosto de 2005.....	55

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1	Distribuição do número de microorganismos mesófilos (A) e psicrotróficos (B) em hortaliças minimamente processadas ao longo de um ano. Cada ponto representa a média da contagem de microorganismos UFC/g (\log_{10}) de 4 amostras mensais e o respectivo desvio padrão; durante o período de setembro de 2004 a agosto de 2005.....	38
FIGURA 2	Níveis bimestrais de coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i> - NMP/g (\log_{10}) em hortaliças minimamente processadas. Cada ponto representa a média de 4 amostras e o respectivo desvio padrão no período de setembro de 2004 a julho de 2005; onde coliformes totais foram (●); coliformes fecais (□) e <i>E. coli</i> (▲).....	47
FIGURA 3	Distribuição da presença de <i>Eimeria</i> spp. em amostras de hortaliças minimamente processadas ao longo de um ano. O gráfico apresenta a frequência relativa de amostras, onde parasitos encontrados foram (■) ou ausência de parasitos (□).....	52
FIGURA 4	Distribuição bimestral de sujidades em amostras de hortaliças minimamente processadas, no período de setembro de 2004 a agosto de 2005. O gráfico apresenta a frequência relativa dos níveis raro (□), moderado (□) e abundante (■) de sujidades.....	58

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% =	percentual
± =	mais ou menos
> =	maior
< =	menor
°C =	graus Celsius
® =	marca registrada
APC =	contagem aeróbica em placa
APPCC=	análises dos perigos e pontos críticos de controle
cm =	centímetro
δ=	desvio padrão
DTA =	doenças transmitidas por alimentos
d =	densidade
g/L =	grama por litro
g/mL =	grama por mililitro
g =	força de gravidade
g =	grama
h =	horas
IMVC=	Indol, VM, VP e citrato
mL =	mililitro
log =	logaritmo na base dez (10)
log ₁₀ =	logaritmo na base dez (10)
mm=	milímetro
NMP =	número mais provável
NMP/g=	número mais provável por grama
pH=	potencial hidrogeniônico
p =	probabilidade
ppm =	parte por milhão
sp.=	espécie
spp. =	espécies
UFC =	unidades formadoras de colônias
UFC/g =	unidades formadoras de colônias por grama
VM =	Vermelho de metila
VP =	Voges-Proskauer
(x) =	vezes

1. INTRODUÇÃO

As frutas e hortaliças cruas são uma importante fonte de nutrição e um dos componentes vitais para uma dieta saudável e balanceada, sendo seu consumo recomendado praticamente sem limitação quantitativa. Novos recursos e tecnologias têm surgido para disponibilizar sua oferta no comércio, aumentando sua vida útil e mantendo o produto com qualidade nutricional e sensorial mais próxima daquele “in natura”. Em vista disso, a oferta dos produtos prontos para consumo ou também conhecidos como minimamente processados tem sido estimulada e seu consumo aumentado nos últimos anos. Os produtos minimamente processados são aqueles que passam por algum tipo de processamento, ou seja, acontece alguma modificação na sua forma natural, porém mantém a qualidade do produto fresco.

Os vegetais prontos para consumo conservam muito sua microflora após o processamento mínimo. A presença desta carga microbiana pode causar problemas na qualidade das hortaliças, principalmente após o processo de corte que deixa grandes áreas do vegetal expostas, ocorrendo liberação de líquidos celulares e vasculares, permitindo uma multiplicação bacteriana e conseqüente deterioração dos produtos. Após o corte, os vegetais passam por

outras etapas, dentre elas, a desinfecção que também pode tornar-se ineficaz se não forem usados bons sanificantes, em concentrações e quantidades adequadas.

Outros fatores ligados à contaminação das hortaliças são o cultivo e a irrigação das mesmas. Os adubos, conhecidos como orgânicos são preparados com dejetos de origem animal, os quais devem ser tratados antes de seu uso para eliminar os microrganismos patogênicos e formas parasitárias. A água que irriga as hortaliças deve ser monitorada e sua origem deve ser conhecida.

As condições higiênico-sanitárias em hortaliças consumidas cruas provenientes de supermercados, sacolões, feiras-livres e mercearias são mais estudadas. Em todos os tipos de hortaliças com esta procedência, considera-se que o consumidor, após comprar as verduras, deverá proceder a um tratamento, ou seja, a higienização das mesmas antes do seu consumo. Entretanto, as saladas cruas servidas em restaurantes “self-service”, “fast-food” e outros estabelecimentos ou empresas que servem refeições coletivas, devem estar higienizadas, pois são consumidas durante as refeições.

As hortaliças minimamente processadas estão prontas para consumo, vão direto à mesa do consumidor. A preferência por tais produtos é justificada pela sua praticidade, sua qualidade e pela diminuição do lixo doméstico.

Por outro lado, esta qualidade deve ser avaliada, pois os produtos prontos para consumo podem transportar microrganismos patogênicos ou elementos parasitários patogênicos ao homem, podendo causar doenças bacterianas ou parasitárias. Diante disto, torna-se importante verificar as condições higiênico-sanitárias dos diversos alimentos prontos para consumo, principalmente as hortaliças que são consumidas cruas. O estudo de parâmetros microbiológicos e parasitológicos são meios utilizados para garantir a segurança de tais produtos. São também de grande importância para a saúde pública, uma vez que fornecem dados sobre as condições de higiene envolvidas na produção, no armazenamento, transporte e manuseio desses produtos.

Alimentos em geral devem estar em condições higiênico-sanitárias adequadas para o consumo. Nas hortaliças minimamente processadas é esperado que nenhuma contaminação ocorra. Para avaliação desta situação são usados os coliformes totais e fecais ou coliformes termo-tolerantes e o microrganismo *Escherichia coli*, o qual é indicador de contaminação fecal mais conhecido. Conforme estabelecem os órgãos de vigilância na avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados quando encontrados parasitos e/ou sujidades e, comprovado o perigo à saúde, os produtos devem ser considerados impróprios para consumo.

O presente estudo teve como objetivo quantificar microrganismos mesófilos e psicrotróficos, coliformes totais e fecais e verificar a presença de *Escherichia coli*, parasitos e sujidades em hortaliças prontas para o consumo, incluindo diferentes tipos de saladas, todas com processamento mínimo e obtidas em redes de supermercados da cidade de Porto Alegre-RS.

Os resultados das diferentes análises permitem gerar uma avaliação da qualidade e segurança das hortaliças minimamente processadas prontas para serem consumidas. Também fornecem elementos que podem contribuir para estabelecimento de padrões microbiológicos e microscópicos, auxiliando na elaboração de uma legislação mais dirigida a esse tipo de produto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos minimamente processados

A busca por alimentos frescos, de baixa energia, saudáveis, nutritivos e de alta qualidade é cada vez maior. Consumidores vêm modificando seus hábitos alimentares e cada vez estão mais conscientes da relação entre dieta e prevenção de doenças. Alimentos frescos são tidos como mais nutritivos e saborosos que os produtos alimentícios industrializados. Frutas e vegetais frescos, pré-preparados, tornam-se cada vez mais populares como itens de conveniência, face à praticidade decorrente desse pré-preparo, pois são comercializados lavados, descascados, cortados e empacotados (Maistro, 2001).

O crescimento mais rápido ocorreu no segmento dos “frescos cortados”, produtos higienizados, cortados e embalados, como cenouras em cubos e alface picada, tornando-os populares entre os consumidores em geral e também entre empresas atuantes, por demandarem menos tempo na sua preparação e solucionarem o problema com resíduos, pois esses são praticamente eliminados, resultando assim, em desperdício quase nulo (Garg et al., 1990).

O pré-corte e empacotamento do produto fresco é uma indústria que vem crescendo rapidamente. Dois fatores propiciaram este crescimento: primeiro, os consumidores perceberam que os produtos frescos processados são saudáveis e convenientes. São oferecidos limpos, prontos para servir, tendo qualidade igual ao fresco. Segundo, a indústria de alimentos é uma força movida em torno deste mercado em expansão (Hurst & Schuler,1992).

Vegetais minimamente processados podem ser simplesmente vegetais aparados (por exemplo: alface inteira com folhas externas retiradas) ou vegetais aparados, descascados, cortados em fatias ou tiras, lavados e/ou desinfetados, empacotados e armazenados em temperatura de refrigeração (Francis et al.,1999).

O empacotamento em atmosfera modificada é uma tecnologia de preservação do alimento por meio da qual, a composição da atmosfera que cerca o produto é diferente da composição do ar (O'Beirne,1990). É um sistema dinâmico em que ocorrem simultaneamente quatro processos: a respiração e transpiração do produto, permeabilidade dos gases através do material de empacotamento e transferência de calor. A composição do gás dentro do pacote é modificada através da respiração do tecido vegetal (modificação passiva). Em consequência desta atividade, o oxigênio do espaço principal é consumido e o dióxido de carbono aumenta. Após algum tempo, uma atmosfera de equilíbrio modificada é criada, dependendo da atividade da respiração do produto, da temperatura do armazenamento e das

características da permeabilidade do material do empacotamento (Exama et al. apud Gimenez et al., 2003).

Com a tendência ao consumo das hortaliças minimamente processadas, a preocupação com os riscos de natureza microbiológica, torna-se acentuada, pois muitas operações como corte, lavagem e embalagem são feitas manualmente, aumentando a possibilidade de contaminações dos produtos (Berbari et al., 2001). Nas saladas, mais do que em outros alimentos, a etapa da manipulação está mais envolvida durante o processamento, visto que são usualmente preparadas sem cozimento (Ayçiçek et al., 2004).

O corte das hortaliças, libera fluídos internos celulares e vasculares, ricos em nutrientes, disponibilizando-os aos microorganismos, permitindo que estes se multipliquem e aumentem a carga microbiana inicial (Farber, 1999). Processos de corte em tiras e fatias são fontes importantes da contaminação do produto minimamente processado. O crescimento acelerado e deterioração ocorrem devido à disponibilidade de nutriente aumentada e às áreas de superfície maiores para o crescimento microbiano (Gleeson & O'Beirne, 2005).

Um estudo realizado por Allende et al. (2004) para avaliar a qualidade microbiológica da alface vermelha processada através da cadeia de produção, mostrou que as contagens microbianas de todos os grupos bacterianos estudados aumentaram aproximadamente 1log de UFC/g após corte em tiras.

Atualmente, vegetais crus frescos de todos os tipos estão tornando-se o mais popular ingrediente de saladas para um consumidor consciencioso sobre a saúde. Contaminações de tais itens por organismos capazes de causar toxinfecções alimentares podem ocorrer sem qualquer percepção na qualidade do produto (Houang et al.,1991).

2.2. Microbiota normal e patógenos encontrados em hortaliças

Os alimentos de origem vegetal devem ser vistos como nichos ecológicos que sustentam uma microbiota dinâmica e variável (Rosa & Carvalho, 2000). Embora a composição exata da biota inicial de frutos e hortaliças não possa ser antecipada, há uma biota característica presente e é possível que quase todos os organismos possam estar presentes em algum momento (APHA,1992).

É provável que mudanças nesta microbiota ocorram durante o processamento e distribuição dos alimentos, as quais podem não afetar diretamente a qualidade, mas podem causar problemas posteriores. Portanto, deve ser estudada para que sejam fixados índices apropriados de qualidade, além de determinar se a biota presente é resultante de contaminação pré-colheita como resultado de contaminação durante o cultivo ou se tem origem pós-colheita por uma manipulação inadequada e processamento de risco (Rosa & Carvalho, 2000).

A microbiota inicial dos vegetais provém do solo, da água, do ar, dos insetos e dos animais (Bonilha & Falcão, 1993/94), sendo diretamente

influenciada pela estrutura da planta e pelo homem com sua tecnologia de cultivo, transporte e armazenamento. A presença da microbiota somada à perda de água causada pelo metabolismo após a colheita, são responsáveis pela deterioração das características de frescor e pela curta vida de prateleira dos vegetais (Silva Jr et al., 1994).

A microflora de vegetais e frutas frescas é diversa, predominando bactérias Gram-negativas. Os níveis de bactérias em plantas no campo pode variar extensamente, e igualmente, em uma única planta os níveis das bactérias em folhas individuais podem diferir substancialmente (Roever, 1998).

O fato da microbiota inicial estar aumentada contribui sobremaneira para a redução da vida de prateleira das hortaliças minimamente processadas que, por sua vez, são produtos prontos para o consumo e devem estar livres de patógenos, especialmente os de importância em saúde pública, cujas fontes potenciais podem estar no manipulador, dejetos de animais, pássaros, insetos e solo (Berbari et al., 2001).

Para limitar a introdução de bactérias patogênicas através da irrigação, a origem e distribuição da água, bem como o histórico do solo devem ser conhecidos. Poços de irrigação devem ser bem cuidados e todas as fontes de irrigação devem ser monitoradas para patógenos humanos. O dejetos usado como fertilizante deve ser tratado para eliminar microrganismos patogênicos. Um tempo máximo também deve ser programado entre aplicação final do dejetos e a colheita (Buck et al., 2003).

Bactérias, protozoários e vírus de interesse em saúde pública, podem sobreviver por extensos períodos em produtos frescos, e sob condições favoráveis, vegetais e frutas frescas podem suportar o crescimento de bactérias patogênicas (Roever, 1998).

Vegetais prontos para consumo retêm muito de sua microflora nativa após processamento mínimo. Patógenos podem fazer parte desta microflora, levando a um potencial problema de segurança (Francis et al., 1999). O desenvolvimento de microrganismos na deterioração de vegetais prontos para consumo depende das propriedades dos microrganismos, das propriedades intrínsecas dos vegetais e dos efeitos do processamento, empacotamento e armazenamento. Cada item do produto deve passar por uma série de passos de processamento, incluindo manipulação, contato com equipamento de corte, lavagem, empacotamento e armazenamento. Cada um desses tratamentos pode afetar o crescimento, sobrevivência e colonização microbiana. Quanto mais etapas operacionais um produto for submetido, mais sua microbiota refletirá o ambiente no qual ele é produzido (Francis et al., 1999).

Em estudo conduzido por Babic et al. (1996), a microflora de mesófilos e psicrotróficos aeróbicos, encontrada em folhas de espinafre fresco cortado, foi inicialmente 10^6 a 10^7 UFC/g. Durante os primeiros 8 dias do armazenamento, aumentou intensamente permanecendo relativamente constante em 10^{10} UFC/g. Também a população total de enterobactérias

mesófilas, aumentou de 5×10^4 UFC/g no primeiro dia, até 10^7 no final do período de armazenamento. Outro estudo de avaliação da qualidade microbiológica de produtos frescos obtidos no varejo mostrou que as médias das contagens de mesófilos aeróbios para cada tipo de produto foram 8,7; 8,6; 7,5; 7,4 e 6,3 \log_{10} para brotos, alface, cenoura, couve-flor e brócolis, respectivamente (Thunberg et al., 2002).

Num estudo realizado para verificar o padrão de comportamento da cepa de *Escherichia coli* D21 introduzida como contaminante em minimamente processados, com níveis que podem ocorrer sob condições de mercado, um comportamento variável nas contagens foi observado durante período de armazenamento. Numa temperatura de armazenamento de 9°C havia um rápido aumento nas populações de *E. coli* em cenoura e pepino minimamente processado (MP), enquanto havia um decréscimo nas populações em tomate MP. Populações viáveis mostraram um aumento de 3 a 6 logs em 10 dias, a partir de seu inóculo inicial (Bharathi et al., 2001).

O significado da presença de *E.coli* em um alimento deve ser avaliado sob dois ângulos. Inicialmente, *E.coli*, por ser uma enterobactéria, uma vez detectada no alimento, indica que esse alimento tem uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias. Outro aspecto a ser considerado, é que diversas linhagens de *E.coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais (Franco & Landgraf, 1996).

Existem cinco grupos de virulência de *E. coli* que são reconhecidos com base nas características das infecções causadas, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos, são eles: *E. coli* enteroagregativas (EaggEC), *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) (Jay, 2005). *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC) é um patógeno emergente que tem estimulado o interesse mundial pelos grandes surtos transmitidos por alimentos. A EHEC pode causar diarreia não-sanguinolenta, diarreia sanguinolenta e a síndrome urêmica hemolítica em todos os grupos de idade, mas os jovens e as pessoas idosas são os mais suscetíveis. O sorotipo de *E. coli* associado mais às EHEC é o 0157:H7, que foi a causa de grandes surtos da doença na América do Norte, Europa e no Japão (Kaper, 1998).

Já foi observado que *Escherichia coli* 0157:H7 foi capaz de se multiplicar em alface cortada em tiras, em pepino fatiado e em cenouras em tiras a temperatura de 12-21°C e em cubos de melão a 25°C. Em temperatura de 5°C *E. coli* 0157:H7 sobreviveu nos melões por 34 horas e até 14 dias na alface em tiras, no pepino e em cenouras (Lin et al., 1996).

2.3. Parasitos presentes em hortaliças

É hábito comum na população humana a ingestão de diversas hortaliças, muitas delas consumidas cruas. O fato de que muitas vezes as hortaliças são mal lavadas, expõe o homem à infecções tanto por helmintos

como protozoários (Branco et al.,1999). As parasitoses intestinais constituem-se num grave problema de saúde pública, sobretudo nos países de terceiro mundo, sendo um dos principais fatores debilitantes da população, associando-se freqüentemente a quadros de diarréia crônica e desnutrição (Ludwig et al. 1999).

A contaminação fecal de hortaliças, notadamente daquelas que são ingeridas “in natura”, constitui o fator de maior relevância na epidemiologia das enteroparasitoses. Isto se deve, sobretudo, ao elevado grau de resistência dos cistos, ovos e larvas às condições ambientais, que persistem por longos períodos de tempo na água, no solo e nas culturas (Shuval et al., 1984). Em estudo conduzido por Coelho et al. (2001), foram encontradas formas transmissíveis de enteroparasitas em hortaliças lavadas para o consumo, em proporção menor que nas hortaliças “in natura”, pois estas haviam sofrido um processo de lavagem para eliminação de impurezas. Entretanto, este processo não foi totalmente efetivo devido à própria contaminação da água ou da verdura “in natura” ou pela manipulação inadequada para o consumo.

Protozoários e helmintos são parasitas de interesse em saúde pública relacionados ao uso da água já utilizada em outros procedimentos. Uma importante característica desses organismos é a produção de um estágio de cisto ou ovo que facilitam sua sobrevivência (Erdoğrul & Şener, 2004).

Os cistos e os ovos sobrevivem e permanecem infectantes durante as temperaturas do verão e do inverno. Estas formas parasíticas são

resistentes à desinfecção por produtos químicos, como cloro e ozônio, os quais são capazes de destruir bactérias e vírus. O potencial para transmissão de parasitoses pela disposição dos resíduos na terra é ampliado, porque estas formas são extremamente resistentes e podem permanecer infectivas por longos períodos no solo (Kelley et al., 1984).

Parasitas comuns que ocorrem em vegetais frescos incluem: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Ascaris* spp. Esses organismos normalmente têm acesso aos vegetais antes da colheita, usualmente como resultado da água de irrigação contaminada e práticas de higiene insuficientes (Francis et al., 1999).

A estrutura vegetal também interfere com o grau de contaminação que o mesmo possa apresentar. Assim, o agrião, apresentando folhas múltiplas e separadas, com grande área de contato, permite maior fixação de enteroparasitas. A alface, por sua vez, apresenta folhas largas, firmemente justapostas, o que dificulta a aderência dos elementos parasitários. A escarola, possuindo características físicas intermediárias, apresenta níveis de contaminação situados entre o agrião e as alfaces lisas e crespas (Oliveira & Germano, 1992b).

Conforme pesquisa realizada por Takayanagi e colaboradores (2001) em hortaliças comercializadas em 172 pontos de venda de Ribeirão Preto – SP, 108 (63%) mostraram a presença de coliformes fecais acima do padrão permitido pela legislação e em 15 (9%) foi encontrado *Salmonella* sp.

Das amostras analisadas, 57 (33%) evidenciaram a presença de enteroparasitas, como: *Entamoeba* sp., ancilostomídeos, *Ascaris* sp., *Cryptosporidium* sp., *Hymenolepis nana*, *Toxocara* sp., cistos e trofozoíto de *Giardia* sp. Esses resultados, relacionados ao produto não processado exposto à venda, chamam a atenção para a possibilidade de acontecer uma contaminação nas hortaliças em que o processamento e sanitização não foram eficientes.

Segundo Paula e colaboradores (2003), a presença de cistos de *Entamoeba coli* em amostras de alfaces de restaurantes “self-service”, demonstra a contaminação das hortaliças por fezes de origem humana, por se tratar de um protozoário intestinal do homem, embora não patogênico, podendo ter sido oriunda de falhas na higienização ou através da manipulação. Amostras de alfaces “in natura” comercializadas em diversos pontos de venda em Lavras - MG apresentaram baixo padrão higiênico, evidenciado pela presença de formas parasitárias de origem humana ou animal e alta contaminação por coliformes fecais. Em todas as amostras de alfaces, independente do tipo de estabelecimento (sacolões, supermercados e feiras-livres), ocorreu algum tipo de contaminação (Guimarães et al., 2003).

Em amostras oriundas de restaurantes *self-service*, das cidades de Niterói e do Rio de Janeiro, detectou-se contaminantes em todas as hortaliças cruas. Foram encontrados larvas, ácaros, ovos de ácaros, insetos e protozoários de vida livre. A presença destes contaminantes, indica que houve

falhas na higienização ou no acondicionamento nos balcões de exposição ao público (Mesquita et al., 1999).

Os principais protozoários parasitos do homem encontrados em vegetais pertencem às classes Zoomastigophorea, tendo como principal representante o gênero *Giardia*; à classe Lobosea com gênero *Entamoeba*, sendo a *Entamoeba histolytica* causadora da amebiose e à classe Sporozoea com os gêneros *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma* (Rey, 2002).

Parasitos de importância veterinária pertencem à classe Sporozoea abrangendo a família Sarcocystidae e família Eimeriidae, destacando o gênero *Eimeria* e *Isospora*, onde os parasitos são principalmente intracelulares do epitélio intestinal. O gênero *Eimeria* tem como hospedeiros aves domésticas, bovinos, ovinos, caprinos, suínos, eqüinos e coelhos. Sua localização é principalmente as células epiteliais do intestino destes animais (Fortes, 1993).

Muitos surtos de gastroenterites causados por protozoários patogênicos já ocorreram, sendo que nos últimos anos foi dada maior atenção à transmissão associada aos alimentos. *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Cyclospora* são reconhecidos como parasitos transmitidos pela água e, atualmente, têm sido associados com diversos surtos transmitidos por alimentos. Enquanto os oocistos de *Cyclospora* requerem um período de maturação, os oocistos de *Cryptosporidium* e os cistos de *Giardia* são imediatamente infecciosos ao hospedeiro. Em consequência, estes parasitos emergiram como riscos à saúde

pública e transformaram-se em interesse à indústria de alimento (Rose & Slifko, 1999).

Ambos protozoários, *Giardia* e *Cryptosporidium*, têm potencial de causar doenças transmitidas por alimentos, ou água. Surtos da doença têm ocorrido, mas tendem a envolver menos casos relatados do que àqueles atribuídos à água de beber. A dose infectiva para *Giardia* está entre 10 e 100 cistos e o período de incubação nos seres humanos é em torno 1 a 2 semanas. *Giardia* é o parasito mais isolado em todo o mundo (Dawson, 2005).

A espécie *Cyclospora cayetanensis* ocorre somente em humanos e a coccidiose é adquirida pela ingestão de oocistos que requerem um tempo mínimo, umidade e temperatura moderada para esporular e tornaram-se infectivos (Mansfield & Gajadhar, 2004). Oocistos de *Cyclospora cayetanensis*, quando inteiramente esporulados, são capazes de infectar os indivíduos que os ingeriu. A transmissão indireta pode ocorrer se uma pessoa infectada contamina o ambiente e os oocistos têm tempo suficiente e condições apropriadas para tornarem-se infecciosos. Surtos têm sido associados à água contaminada, vários tipos de produtos frescos e alimentos. Os modos de transmissão e fontes destas infecções não têm sido completamente esclarecidos (Mansfield & Gajadhar, 2004).

Num estudo realizado no Peru, amostras de vegetais foram coletadas em pequenos mercados, durante as estações de elevada e baixa incidência para ciclosporidiose e testadas para oocistos de *C. cayetanensis*.

Oocistos do *C.cayetanensis* foram encontrados em 1,8% dos vegetais amostrados, indicando que a transmissão pelos vegetais do mercado pode ser comum. Neste estudo, também observou-se que a lavagem dos vegetais não remove todos os oocistos (Ortega et al., 1997).

2.4. Surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA)

Vários surtos de gastroenterites têm sido associados ao consumo de vegetais frescos contaminados e, em menor quantidade, às frutas. Saladas contendo vegetais crus contaminados têm sido identificadas como veículos da diarreia dos viajantes, uma doença que afeta pessoas que visitam países em desenvolvimento. *Escherichia coli* enterotoxigênica é a mais comum causa desta doença. *Escherichia coli* entero-hemorrágica, sorotipo O157:H7 tem sido implicada como agente causador de surtos de gastroenterites associadas ao consumo de mamões (Beuchat, 1996).

Em 1995, um surto das infecções da *E. coli* O157:H7 que envolveu no mínimo 29 pessoas em Montana, foi epidemiologicamente ligado ao consumo de folhas de alface. O mecanismo da contaminação não foi determinado. Entretanto, a alface foi irrigada com água de superfície e investigações revelaram falta de higiene nos métodos de manipulação das folhas de alface (Roever, 1998).

Outro surto também provocado por *E. coli* O157:H7 nos estados de Connecticut e Illinois, foi associado ao consumo de alface, a partir de um único produtor. As investigações revelaram práticas de cultivo e processamento

como prováveis fontes do patógeno: presença de gado e galinhas com acesso às áreas de crescimento das alfaces. A água de lavagem das alfaces foi a mais provável fonte de contaminação. Nesta investigação, concluiu-se que as práticas de produção de alface devem ser monitoradas para segurança microbiológica (Hilborn et al., 1999).

No Brasil, a falta de dados sobre toxinfecções relacionadas a produtos frescos ainda é grande e pode ser justificada pela curta vida de prateleira, pela dificuldade de contra-prova, pelo grande número de fornecedores diferentes e pela distribuição bastante grande de produtos frescos em um curto espaço de tempo, dificultando a rastreabilidade de agentes patogênicos. Apesar de não registradas, essas doenças não devem ser negligenciadas (Brugalli et al., 2000).

Um grupo de patógenos transmitido por alimentos que tem recebido pouca atenção em países em desenvolvimento são os parasitos (Francis, et al. 1999). Grande número de enfermidades entéricas são veiculadas através de hortaliças contaminadas, destacando-se entre os agentes etiológicos os helmintos e os protozoários (Siqueira et al., 1997). Evidências epidemiológicas e laboratoriais mostraram, que a provável fonte do protozoário *Giardia lamblia*, num dos surtos ocorridos em vegetais crus fatiados, foi a partir de um manipulador de alimentos. O consumo dos vegetais implicados não foi associado à água de riachos, rios ou lagos. Este surto sugeriu que a giardíase

foi transmitida através de alimento servido em muitos estabelecimentos comerciais e casas (Beuchat, 1996).

Poucos surtos de criptosporidiose transmitidos através dos alimentos foram estudados e aqueles que têm acontecido, foram provavelmente devido à contaminação ambiental. Um surto ocorrido nos Estados Unidos em 1993, foi associado ao suco de maçãs frescas não pasteurizado. As maçãs usadas para o suco foram, provavelmente, contaminadas por fezes do gado ao caíram em solo de pastagem (Dawson, 2005).

2.5. Qualidade microbiológica e condições higiênico-sanitárias em hortaliças

A ocorrência de microrganismos em vegetais deve refletir a qualidade sanitária das etapas do processamento e as condições microbiológicas do produto fresco na hora do processo (Jay, 2005). Em muitos casos, como nos alimentos processados, a contagem padrão demonstra o nível geral de higiene durante a fabricação, condições de armazenamento e transporte daquele alimento, enquanto em produtos não processados pode servir como indicador da qualidade do alimento (Brasil, 1992). A presença de certos microrganismos pode ser usada como um indicador da segurança alimentar e/ou detecção de processamento incorreto (Soriano et al., 2001).

Métodos de manipulação, processamento, empacotamento e distribuição de produtos frescos em escala local ou regional entre os países

estão recebendo atenção em termos de identificação e controle dos perigos microbiológicos. Programas de análises dos perigos e pontos críticos de controle (APPCC) estão sendo desenvolvidos num esforço para minimizar o risco de doenças associadas com consumo de produtos frescos (Beuchat, 1996). O método APPCC estuda os perigos e indica os controles dos pontos críticos prioritários, enquanto que o manual de boas práticas configura procedimentos que devem ser seguidos para o controle higiênico-sanitário eficaz. Portanto não existe método APPCC sem um manual de boas práticas implantado (Silva Jr, 2002).

O elevado grau de contaminação por mesófilos aeróbios evidenciado em amostras oriundas de restaurantes *self-service*, indica que tais alimentos não suportariam um tempo de armazenamento longo podendo acarretar prejuízo econômico (Paula et al., 2003).

Quando presentes em número elevado, os psicotróficos podem causar uma variedade de alterações em produtos conservados sob refrigeração. A elevação do seu número está associada a uma estocagem prolongada sob refrigeração ou manutenção à frio inadequada, ou ainda, pode significar risco de alteração tanto para produtos processados como não processados (Brasil, 1992). A contagem da flora bacteriana psicotrófica em alimentos congelados e conservados sob refrigeração pode relacionar-se com as condições de conservação e são indicativos da qualidade bacteriológica destes produtos (Mossel, 1982). Na refrigeração ou no congelamento, alguns

patógenos podem perder a viabilidade, quando armazenados por tempo prolongado, mas nem todos são eliminados. Em temperaturas abaixo de 28°C, psicrotóxicos multiplicam-se, alterando rapidamente os alimentos (Silva Jr, 2002).

Em estudos realizados por Ayçiçek e colaboradores (2004), concluíram que a presença de coliformes e *E.coli* em alguns alimentos indicam práticas insatisfatórias de manipulação e contaminação cruzada em cozinhas ou unidades de hospitais. Níveis de higiene pessoal e contaminações cruzadas deveriam ser melhorados nestes locais. Em saladas e outros pratos a presença de *E. coli*, coliformes e *Staphylococcus* coagulase negativa indicam contaminação pós-cozimento ou pós-preparação. Ao mesmo tempo, esses resultados indicam um longo tempo e temperatura inadequada durante o cozimento, processamento e distribuição das comidas quentes. Alternativamente práticas de gerenciamento na agricultura, como parte do crescimento, colheita, lavagem, seleção, embalagem e transporte relacionados a vegetais podem também ser impróprios (Ayçiçek et al., 2004).

Um estudo para demonstrar a contaminação de cenouras e alhos pela inoculação da *E.coli* 0157:H7 em campos ou água de irrigação, resultou na contaminação das hortas e campos por vários meses. O perigo da manipulação imprópria do adubo orgânico (dejeito de aves ou bovinos) manifestou-se como contaminação microbiana direta do produto, das fontes de água, dos animais, ou mesmo dos seres humanos. Considerando que a fonte

da contaminação na maioria de surtos da infecção não é determinada conclusivamente, os riscos da manipulação imprópria dos dejetos provavelmente são subestimados (Islam et al., 2005).

Em amostras oriundas de restaurantes “self-service”, verificou-se a detecção de coliformes fecais acima do limite tolerável pela legislação e, em algumas amostras, acima do limite da detecção da metodologia aplicada, indicando que as hortaliças estudadas (alfaces) encontravam-se inadequadas para o consumo (Paula et al, 2003).

Os resultados dos estudos realizados por Siqueira et al. (1997) mostraram que 44% de saladas cruas dos restaurantes industriais da Grande Belo Horizonte apresentaram condições higiênicas insatisfatórias, sendo que 7% ofereciam produtos potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar, ressaltando que estes alimentos sofrem processos de lavagem e higienização antes de serem expostos para o consumo.

A detecção de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias reforça a importância do controle mais rigoroso durante as etapas de processamento e conservação, no que diz respeito ao binômio tempo x temperatura para a manutenção adequada dos produtos alimentícios, evitando, assim, os surtos de toxinfecção alimentar (Siqueira et al., 1997).

2.5.1. Indicadores de contaminação

O grupo dos coliformes totais inclui bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não-esporulados, aeróbios ou anaeróbios

facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48h a 35°C. Inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como por exemplo: *Serratia* e *Aeromonas* (Silva et al.,1997). Os coliformes fecais produzem ácidos e gás em caldo de *Escherichia coli* (Caldo EC) em temperaturas usualmente de 44,5 °C ou 45,5 °C. Este grupo inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo os dois últimos de origem não fecal. *Escherichia coli* tem habitat reconhecidamente fecal, está dentro do grupo de coliformes fecais. É a mais conhecida e mais facilmente diferenciada dos microorganismos não fecais, sendo o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (Silva et al.,1997). *E. coli* pode ser um indicador na análise de produtos crus, mas a presença de outros membros da família Enterobacteriaceae não deve necessariamente estar associada à contaminação fecal (Soriano et al., 2001).

Conforme a Portaria N° 518, de 25 de março de 2004 que estabelece os procedimentos relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, a definição de coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) inclui a maioria das bactérias que pertencem aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo. Coliformes termotolerantes – são um subgrupo das bactérias do grupo

coliforme que fermentam a lactose a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas; tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal (Brasil, 2004).

Até o momento a *Escherichia coli* é o indicador sanitário ideal na análise microbiológica de alimentos crus ou que não tenham sido submetidos a tratamento térmico para assegurar sua inocuidade. A presença de *E. coli* em alimento indica que ocorreu uma contaminação de origem fecal e que, conseqüentemente, existe o risco potencial de que tenham chegado ao alimento outros microrganismos de origem entérica (Brasil, 1992). Na escolha de um organismo indicador de contaminação fecal é importante a observação de algumas características, entre elas: ter como habitat natural apenas o trato intestinal humano ou de outros animais homeotérmicos, não se multiplicando facilmente fora deste ambiente; ser mais resistente que os patógenos; ser facilmente evidenciado pelas técnicas laboratoriais simples. O bacilo Gram-negativo, *Escherichia coli*, reúne tais características, sendo o indicador mais utilizado para detecção de contaminação fecal recente (Cabrini, 2002).

Jay (2005) completa as características de um indicador de segurança dos alimentos que deve apresentar-se como:

- ser detectável de forma fácil e rápida;
- ser facilmente distinguido de outros membros da microbiota;
- ter um histórico de associações freqüentes com o patógeno cuja presença deve indicar;

- sempre estar presente quando o patógeno de interesse estiver presente,
- ser um microrganismo cujos números das contagens estejam correlacionadas com as do patógeno de interesse;
- possuir necessidades e taxa de crescimento equivalente às do patógeno;
- possuir uma taxa de morte pelo menos paralela à do patógeno de interesse e sobreviver um pouco mais do que ele;
- estar ausente dos alimentos livres do patógeno de interesse, exceto quando em pequenas concentrações.

2.5.2. Legislação

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão ligado ao Ministério da Saúde estabelece os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. No grupo de alimentos: Hortaliças, legumes e similares tipo frescas, "in natura", preparadas (descascadas, ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, com exceção de cogumelos. As características microbiológicas das hortaliças devem obedecer ao seguinte padrão: bactérias do grupo coliforme de origem fecal: máximo 10^2 NMP/g (BRASIL, 2001). Também estabelece que a denominação de "coliformes a 45°C" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes".

Segundo o regulamento técnico de avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados, aprovado pela Resolução RDC N°175, de 8 de julho de 2003, considera-se como matéria prejudicial à saúde humana: aquela matéria detectada macroscopicamente e ou microscopicamente, relacionada ao risco à saúde humana e abrange insetos, em qualquer fase de desenvolvimento, vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos; outros animais vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos; parasitos; excrementos de insetos e ou de outros animais; objetos rígidos, pontiagudos e ou cortantes, que podem causar lesões no consumidor.

Neste regulamento estão definidos como vetores mecânicos: animais que veiculam o agente infeccioso desde o reservatório até o hospedeiro potencial, agindo como transportadores de tais agentes, carreando contaminantes para os alimentos, causando agravos à saúde humana, mas não são responsáveis pelo desenvolvimento de qualquer etapa do ciclo de vida do contaminante biológico. Matérias microscópicas, são aquelas que podem ser detectadas com auxílio de instrumentos ópticos e matérias macroscópicas, são aquelas que podem ser detectadas por observação direta (olho nu) sem auxílio de instrumentos ópticos (Brasil, 2003).

Atividades de vigilância sanitária devem ser concentradas na produção de hortaliças, por meio de ações educativas aos produtores e do

monitoramento laboratorial das águas destinadas à irrigação das hortas (Oliveira & Germano, 1992b).

O código Federal de Regulamentação dos Estados Unidos, permite à Food and Drug Administration (FDA), estabelecer níveis máximos de defeitos naturais ou inevitáveis em alimentos para uso humano que não apresentem risco à saúde. Os níveis destes defeitos encontram-se enumerados no manual *The Food Defect Action Levels* da Food and Drug Administration (FDA, 1998).

Segundo os critérios estabelecidos por este manual, se não houver nenhum nível da ação do defeito para um produto, ou quando os achados mostram níveis ou tipos de defeitos que não se adequam aos critérios estabelecidos, a Food and Drug Administration (FDA) avalia as amostras e decide caso a caso. Neste procedimento, os peritos técnicos em sujidades e materiais estranhos usam uma variedade de critérios, para determinar o significado e o impacto dos achados relatados, por exemplo, comprimento dos cabelos, dos tamanhos de fragmentos do inseto, da distribuição da sujidade na amostra e das combinações dos tipos encontradas. Além disso, a FDA interpreta os achados considerando a informação científica disponível (por exemplo, ecologia da espécie animal representada) e o conhecimento de como um produto é crescido, colhido e processado. Os processadores de alimento podem encontrar estas informações como uma ferramenta do controle de qualidade em sua operação (FDA, 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Os locais escolhidos para coleta das amostras foram supermercados de duas grandes redes, situados na região metropolitana de Porto Alegre. Os supermercados foram escolhidos por oferecerem uma ampla variedade de produtos e atenderem a um consumidor mais exigente para este tipo de alimento. Foram adquiridas quatro amostras mensais em lojas que pertenciam às duas redes escolhidas. Para definir o número de amostras foi considerado o valor do produto, sendo este mais oneroso que as amostras “in natura”, totalizando 12 pacotes mensais. Além disso, quatro amostras mensais é uma quantidade que permite uma avaliação de sazonalidade.

O período de análises foi de 12 meses, com início no mês de setembro de 2004 e término no mês de agosto de 2005. Um total de 48 amostras foram analisadas mensalmente para contagem de microrganismos mesófilos e psicotróficos. A contagem de coliformes e *E. coli* foi realizada bimestralmente, assim como a presença de sujidades, totalizando 24 amostras analisadas. A presença de parasitos foi verificada mensalmente.

O produto utilizado como amostra (saladas verdes e saladas mistas) encontrava-se em embalagens fechadas em pacotes semipermeáveis e

mantido sempre em ambiente refrigerado. Foram anotados dados como: data de fabricação, prazo de validade e a temperatura de armazenamento. Três marcas diferentes de saladas prontas para consumo foram escolhidas para as análises. Para a escolha das marcas foi considerada a disponibilidade do produto no supermercado e no dia da coleta, assim as hortaliças poderiam ser encontradas em todas as coletas. Os ingredientes variavam entre vários tipos de alface e outras folhas verdes, tempero verde, cebolinha, “croutons” coloridos e diferentes legumes. Todas encontravam-se em pacotes individuais com atmosfera modificada sempre respeitando a data de fabricação e validade do produto. Imediatamente após a aquisição, as amostras foram transportadas em sacolas térmicas e levadas para o Laboratório de Microbiologia do ICBS-UFRGS para realização das análises.

3.2 Preparo das Amostras

As análises foram realizadas logo após a coleta, em condições de assepsia. Cada amostra a ser analisada foi constituída por um “pool” formado por três pacotes oriundos do mesmo lote e com igual peso. O conteúdo dos três pacotes foi colocado em um único frasco estéril, em seguida misturado com auxílio de colher e bastão de vidro e pesadas a fim de se retirar a unidade analítica da mistura. Uma amostra de 25g foi adicionada a 225 mL de água peptonada a 0,1% (Merck®) estéril e homogeneizada várias vezes. A partir da suspensão, foram realizadas as diluições decimais seriadas em água peptonada a 0,1% (Merck®) até a diluição 10^{-6} . Os frascos foram agitados

manualmente de maneira vigorosa por aproximadamente 25 vezes, anteriormente à semeadura nas placas e à inoculação nos tubos contendo o caldo lactosado. Numa segunda etapa foram pesadas 200 g da referida amostra para a análise parasitológica e 100g para a análise de sujidades.

3.3. Análises microbiológicas

As análises para contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotrófilos foram realizadas mensalmente durante o período de setembro de 2004 a agosto de 2005. Para contagem (NMP/g) de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*, as análises foram feitas bimestralmente durante o mesmo período. A contagem aeróbica em placas foi mensal, por ser uma técnica mais simples e de fácil realização. Os coliformes exigem mais disponibilidade de tempo durante as análises, além de um requerer mais vidraria e meios na realização dos testes.

3.3.1. Contagem total de mesófilos

Para a determinação de microrganismos mesófilos o meio utilizado foi o Ágar Padrão para Contagem (PCA, Himedia®) e o sistema utilizado foi o de semeadura em profundidade. Foram selecionadas três diluições seriadas, sempre a partir da diluição 10^{-3} . A partir das três diluições selecionadas, com 1 mL de cada diluição foi realizada a semeadura, a qual foi feita em duplicata para cada diluição. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por período de 24-48 horas para visualização das colônias de mesófilos. Foram selecionadas as placas que apresentavam entre 25 a 250 colônias e a contagem foi realizada

com auxílio de um contador de colônias. Os resultados foram expressos em Unidade Formadoras de Colônia por grama (UFC/g) de hortaliça (Silva et al.,1997).

3.3.2. Contagem total de psicrotróficos

Para a determinação de microrganismos psicrotróficos o meio utilizado foi o PCA (Himedia®) e o sistema foi o de semeadura em superfície. As diluições foram as mesmas selecionadas para o item anterior e 0,1 mL de cada diluição foi semeado nas placas de PCA (Himedia®). A semeadura foi feita em duplicata para cada diluição e as placas foram incubadas em geladeira a 10°C por um período de até 7 dias. A contagem das colônias e o cálculo dos resultados seguiu o mesmo procedimento feito para contagem de mesófilos.

3.3.3. Número mais provável de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* (NMP)

As amostras foram analisadas pela técnica dos tubos múltiplos segundo a American Public Health Association, descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, conforme APHA, 1992 (Silva et al.,1997). Além do APHA, o método do NMP é empregado por outros órgãos ambientais, como: “Bacteriological Analytical Manual” da Food and Drug Administration. A metodologia é de fácil detecção e permite estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes numa amostra, fornecendo os resultados de maneira quantificada. Essas razões explicam a opção pelo

método do NMP para determinar coliformes e *Escherichia coli* em amostras de hortaliças.

Teste presuntivo

O meio de cultura empregado foi o Caldo Lactosado (CL Biobrás®). Ao qual foi acrescentado púrpura de bromocresol (Merck®), na concentração de 0,001%. Três diluições seriadas da amostra foram selecionadas e inoculadas em uma série de três tubos de Caldo Lactosado por diluição, adicionando 1,0 mL da diluição por tubo contendo caldo lactosado. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 24-48h. Os tubos com formação de gás no tubo de Durhan e produção de ácido evidenciado pela cor amarela foram presuntivamente considerados positivos.

Teste confirmativo para coliformes totais

Alíquotas dos tubos considerados positivos foram inoculadas, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, em Caldo Verde Brillante Bile 2% (CVBB -Biobrás®) e incubados a 37°C por 24-48h. Os tubos com produção de gás nos tubos de Durhan foram considerados positivos para confirmação de coliformes totais. Os resultados foram baseados no número de tubos que exibiram produção de gás para as três diluições consecutivas e expressos como NMP de coliformes totais/g de amostra.

Teste confirmativo para coliformes fecais

Da mesma maneira que na confirmação de coliformes totais, alíquotas dos tubos positivos no Caldo Lactosado foram inoculadas para tubos

em Caldo *E.coli* (EC Merck®). Os tubos foram incubados em banho-maria a 44,5°C por 24-48h. Os tubos com produção de gás nos tubos de Durhan foram considerados positivos para confirmação de coliformes fecais. Os resultados foram expressos como NMP/g de hortaliça (Silva et al.,1997).

Teste confirmativo de *Escherichia coli*

De cada tubo de Caldo EC com produção de gás em 24h ou 48h foi realizada a semeadura em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB, Merck®). As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Foi observado o crescimento de colônias típicas de *E.coli* (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico), que foram isoladas e transferidas para tubos com Ágar Tripticase de Soja (TSA, Himedia®) e incubadas a 35 °C por 24h. A partir das culturas puras em TSA, foi feita a coloração de Gram e inoculadas nos meios para realização das provas bioquímicas IMVC. Foi considerado como *E.coli* todas as culturas com as seguintes características: bastonetes Gram negativos, teste de Indol: positivo ou negativo (Agar SIM Biobrás®), teste VM (positivo), VP (negativo) (8.4) e teste de Citrato (negativo) (Biobrás®). O número de tubos de Caldo EC, semeados em placas contendo meio EMB, confirmados como *E.coli* foi anotado para determinar o NMP/g na tabela adequada às diluições inoculadas. Os isolados de *E.coli* obtidos das amostras analisadas foram enviados para Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para realização de testes sorológicos.

3.4. Análise parasitológica

Foram pesadas 200g das hortaliças minimamente processadas, separadas em bacia de plástico retangular, e em seguida lavadas (pinceladas) individualmente com 300mL de solução de detergente neutro (0,5%) recém-preparada em solução fisiológica a 0,9% (Oliveira & Germano,1992a). A solução obtida da lavagem foi submetida ao método de Lutz (Hoffman et al., 1934), em seguida a bacia foi lavada 2 vezes com 10mL da solução detergente, recolhendo-se o líquido no cálice de sedimentação, deixando em repouso por 24 horas. Após este período, uma alíquota de aproximadamente 2 gotas do sedimento foi retirada e examinada em duplicata ao microscópio ótico nas objetivas 10x e 40x. Posteriormente, o líquido sobrenadante foi desprezado e recolhido o sedimento para um tubo de centrífuga de 30 mL. O cálice foi lavado 2 vezes com 5 mL de solução fisiológica, recolhendo-se o líquido no mesmo tubo. Foi realizado o método de centrífugo-flutuação (Faust et al., 1938). O sedimento foi centrifugado a 5,8xg, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com solução de sulfato de zinco (Synth ®) com densidade de 1,18g/mL. Foi feita análise para observação de estruturas parasitárias em microscópio ótico em objetiva de 10x e 40x.

3.5. Análise de sujidades por filtração

Cem gramas da amostra foram retiradas e homogeneizados em frasco grande com cerca de 400mL água destilada. A solução obtida foi filtrada através do funil de Büchner contendo papel filtro de 13,5 cm de diâmetro. Foi

utilizada uma bomba de vácuo para promover a filtração. O papel filtro foi retirado logo após a filtração e examinado em toda a sua dimensão ao estereomicroscópio marca Olympus modelo sz 40 para verificar a presença de sujidades retidas. As sujidades encontradas foram enumeradas baseando-se num critério de quantidade. Foram estabelecidos três níveis definidos como segue: nível 1=raro, representa de zero até 3 sujidades, nível 2=moderado, de 3 a 5 elementos e nível 3=numeroso com 5 ou mais sujidades. Os resultados foram expressos como presença ou ausência de sujidades.

3.6. Análise estatística

Os resultados das análises realizadas no decorrer dos meses e estações (períodos estacionais) foram submetidos à ANOVA de um fator e teste de correlação linear simples, em conformidade com Vieira (1998). O software estatístico utilizado foi o StartDirect (v 2.5.3). As diferenças entre os tratamentos e entre as amostragens foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Análises microbiológicas das hortaliças minimamente processadas

4.1.1. Contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos

Os valores médios para contagem de mesófilos apresentaram níveis variando de 5,68 log₁₀ UFC/g a 8,21 log₁₀ UFC/g nos meses de julho e março de 2005, respectivamente (FIGURA 1A). Os psicrotróficos variaram entre 6,90 log₁₀ UFC/g e 8,44 log₁₀ UFC/g nos meses de julho e janeiro do ano de 2005, respectivamente (FIGURA 1 B). Os valores apresentados referem-se aos índices mais baixos e mais elevados, respectivamente.

Vegetais em condições de consumo, podem determinar contagens aeróbicas extremamente elevadas por causa da contaminação do solo e de outras fontes naturais. Devido às condições intrínsecas destes vegetais, pouco pode ser feito para diminuir esta carga inicial (Nascimento et al., 2003).

Nos estudos realizados por Ruiz et al. (1987) com vegetais frescos provenientes de campos e outros estabelecimentos, foi encontrado que 91,3% das amostras variaram entre 10⁶ e 10¹⁰ UFC/g para contagem de mesófilos aeróbios.

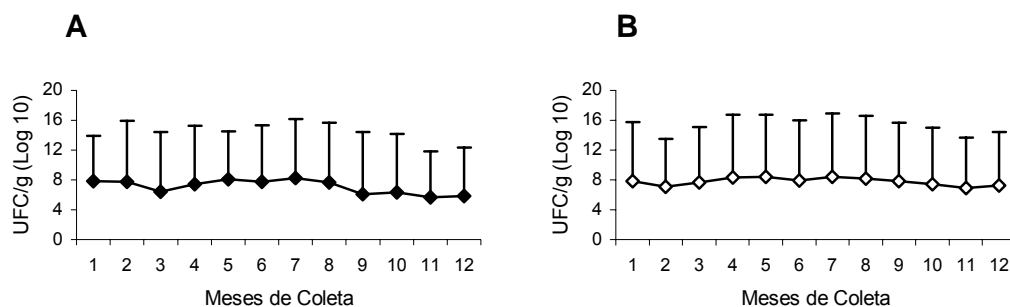


FIGURA 1 - Distribuição do número de microorganismos mesófilos (**A**) e psicrotróficos (**B**) em hortaliças minimamente processadas ao longo de um ano. Cada ponto representa a média da contagem de microorganismos de 4 amostras mensais e o respectivo desvio padrão; o eixo das ordenadas representa o número de UFC/g de hortaliça em logaritmo na base dez (10); o eixo das abscissas representa os doze meses de coleta, que abrangem o período de setembro de 2004 a agosto de 2005.

Nascimento et al. (2003) encontraram níveis médios de mesófilos aeróbios de $6,94 \log_{10}$ UFC/g em alface crespa, não processada, vendida em diferentes mercados de Campinas. As análises microbiológicas do presente estudo indicaram uma média alta para as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, quando comparadas às contagens em produtos frescos, como a alface, evidenciado nos estudos dos autores acima citados.

Os produtos agrícolas crus podem ter contagens em placas extremamente variadas. Nestas situações, as contagens podem fornecer dados significativos às indústrias de processamento que terão uma compreensão melhor dos fatores que podem influenciar a contagem, todavia as contagens fornecem pouco valor com relação aos critérios da aceitação do produto (APHA, 1992).

Os biofilmes também podem ser encontrados nas superfícies e lâminas dos equipamentos, facas, tábuas de corte e outras superfícies que entrem em contato com água. Quando a limpeza e desinfecção destes materiais são inapropriadas, o potencial de biotransferência devido aos biofilmes aumenta. Neste situação é difícil eliminar biofilmes das superfícies. Conseqüentemente, a inspeção de biofilmes torna-se importante no ambiente das fábricas de alimentos e deve ser recomendada como opção para teste do produto final (Kaneco et al., 1999).

Na contagem média dos mesófilos realizada durante as 4 estações do ano, verificou-se diferença de 1 log apenas no inverno, todavia foi uma diferença não significativa ($p > 0,05$). Os demais meses mantiveram um nível de contaminação muito próximo, ou seja, ficaram entre 7,61 \log_{10} e 7,84 \log_{10} UFC/g (TABELA 1).

Na literatura existe uma variação em torno dos valores estabelecidos para alimentos e para os vegetais prontos para consumo. Em geral, contagens aeróbicas entre 10^6 e 10^7 UFC/g são comuns em vegetais prontos para consumo (Jay, 2005). Segundo Mossel (1982), a contagem máxima aceitável de mesófilos aeróbios em vegetais frescos é de 5,0 \log_{10} UFC/g. No Japão, foi definido o valor $< 5,0 \log_{10}$ UFC/g para alimentos, determinado por contagem em placa (APC), como sendo seguro para o consumo, embora não exista nenhum regulamento nacional de alimentos prontos para o consumo (Kaneko et al., 1999). Os resultados do presente

estudo mostraram-se acima destes valores, indicando contagens altas para as hortaliças minimamente processadas prontas para consumo. No Brasil não existe uma legislação específica que estabeleça limites para as contagens microbianas em alimentos em geral e/ou prontos para o consumo, contudo pode-se verificar que os índices obtidos revelam contaminação em alguma das etapas do processamento ou pela carga microbiana inicial, quando comparados com limites estabelecidos por outros países ou aqueles sugeridos por outros trabalhos (Ayçyçek, 2004).

Processos de corte em tiras ou fatias são fontes importantes da contaminação do produto minimamente processado. Verificou-se aumento nas contagens de bactérias mesófilas de 10^3 a 10^4 para 10^5 a 10^6 UFC/g durante o processo de corte em tiras e fatias para uma variedade de vegetais (Gleeson & O'Beirne, 2005). Nos estudos realizados por Babic et al. (1996), em folhas de espinafre cortadas e embaladas em atmosfera modificada a 10°C , contagens de 10^6 e 10^7 foram encontradas para mesófilos e psicrotóxicos, respectivamente, alcançando populações de até 10^{10} UFC/g. O estudo mostrou que as folhas de espinafre continham elevadas populações de mesófilos e psicrotóxicos, com *Pseudomonas fluorescens* sendo a espécie predominante. Temperaturas de refrigeração não retardam totalmente o crescimento microbiano. A razão para esta observação é que muitas espécies de *Pseudomonas* são psicrotóxicos e crescem relativamente rápido sob refrigeração (Brackett, 1992). Portanto, a temperatura de refrigeração e o pH

neutro encontrado nas folhas de espinafre devem fornecer condições de crescimento favoráveis para os psicrotróficos. Segundo Babic et al. (1996), a contaminação do espinafre fresco cortado pode ser explicada pela sanitização insuficiente durante o processamento. Estudos de Garg et al. (1990) mostraram as limitações da desinfecção com cloro para eliminar os microrganismos intrínsecos. Operações do processamento como as lavagens e imersão em água clorada, removeram parcialmente os microrganismos. Outras como corte em fatias ou corte em tiras aumentam as contagens de $1,8 \times 10^4$ UFC/g (antes corte) para $1,4 \times 10^6$ UFC/g (após corte) e $4,0 \times 10^3$ UFC/g (antes) e $1,2 \times 10^5$ UFC/g (depois corte) em vegetais como alface e cebola, respectivamente.

No presente estudo, os resultados para contagem média dos microrganismos psicrotróficos encontravam-se próximos aos dos mesófilos, diferindo em 1 log na estação do verão e 1 log no outono, embora não houvesse diferença significativa ($p > 0,05$). Os índices encontravam-se elevados durante todo período, variando entre $7,25 \log_{10}$ UFC/g e $8,28 \log_{10}$ UFC/g no inverno e verão respectivamente (TABELA 1). Os meses do ano com temperaturas mais altas mostraram contagens mais elevadas. No inverno foram observados índices mais baixos das contagens, $6,03 \log_{10}$ UFC/g e $7,25 \log_{10}$ UFC/g para mesófilos e psicrotróficos respectivamente (TABELA 1). A grande variabilidade encontrada nos resultados das análises realizadas no presente estudo poderia ser explicada pelo fato das amostras passarem por

processos que são estabelecidos pela indústria de produção, contudo esses processos não são padronizados, eles podem variar, ou seja, apresentar fluxogramas de processamento diferentes, sendo adaptados para as exigências de cada indústria. É provável também, que as boas práticas de higiene, assim como, o armazenamento antes da recepção, durante o processamento e nas prateleiras não foi devidamente observado, permitindo assim que ocorressem tais variações nos resultados nas contagens dos microrganismos analisados.

No estudo de Allende et al. (2004) foram encontradas altas contagens de bactérias psicrófilas no ponto de recepção de uma planta de processamento de alface vermelha. Um prolongado período de armazenamento da alface inteira antes do processamento ou microrganismos ocorrendo naturalmente, os quais podem proliferar rapidamente em ambientes frios, são fatores que podem contribuir para o aumento dos psicrófilos.

No experimento de Allende et al. (2004) as contagens bacterianas de mesófilos e psicrófilos aumentaram de 5 para 8 \log_{10} UFC/g após 7 dias a 5°C. O aumento de bactérias psicrófilas aparece quando o produto é refrigerado, sendo assim sua contagem final limita a vida útil do produto. Resultados similares foram encontrados por Lopez et al. (2003) em amostras de cebola e repolho prontos para consumo, com contagens de mesófilos variando de 10^5 a 10^8 UFC/g e de 10^6 a 10^9 UFC/g, respectivamente.

TABELA 1: Média da contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Porto Alegre-RS, durante as quatro estações do ano no período de setembro de 2004 a agosto de 2005.

Estações	Contagem bacteriana média (\log_{10} UFC/g)	
	Mesófilos	Psicrotróficos
Primavera	7,61	7,61
Verão	7,83	8,28
Outono	7,84	8,21
Inverno	6,03	7,25

Comparando os resultados de Allende et al. (2004) com os resultados do presente estudo, pode-se sugerir que as hortaliças encontravam-se com altas contagens antes do processamento, uma vez que após processo de sanificação as contagens permaneciam relativamente altas, o que levaria a um menor tempo de prateleira do produto.

Lopez e colaboradores (2003) determinaram a qualidade microbiológica, analisando amostras de cebola e repolho de dois produtores, produtor A (produtos minimamente processados para cozimento) e um produtor B (produtos minimamente processados prontos para consumo). Foram obtidas contagens de mesófilos entre 10^6 e 10^8 UFC/g para amostras de cebola do produtor A e entre 10^5 e 10^8 UFC/g para o produtor B. No

repolho, os níveis variaram entre 10^7 e $>10^9$ UFC/g para o produtor A, enquanto que para o produtor B, os níveis variaram de 10^6 a 10^9 UFC/g. Comparando os resultados do presente estudo para mesófilos aeróbicos com os obtidos por Lopez et al. (2003), é possível observar que foram bastante similares nos produtos prontos para consumo, apesar das amostras diferirem parcialmente. No presente estudo, foram utilizadas hortaliças diversas, enquanto no trabalho de Lopez et al.(2003) as amostras foram de apenas um tipo. Em produtos indicados como prontos para consumo espera-se uma contaminação menor, já que o produto vem previamente tratado. Estes resultados indicariam que as condições higiênicas e ou tratamentos efetuados não foram suficientes, nem talvez adequados para reduzir a contaminação microbiana inicial presente no produto (Lopez et al. 2003).

Em contrapartida, em um estudo realizado por Kaneko et al. (1999), análises em alimentos prontos para consumo (repolho, alface, cebola, cebola de galês, espinafre, aipo, pepino, pimenta verde, rabanete japonês e cenoura) mostraram valores médios de $5,7 \log_{10}$ UFC/g, onde 21(77,8%) das 27 amostras tiveram valores de contagens $>5,0 \log_{10}$ UFC/g.

4.1.2. Contagem de coliformes totais e fecais e *Escherichia coli*

As análises para os coliformes foram realizadas em 24 amostras, sendo que apenas a amostra 22, julho/2005, apresentou valores $<0,47 \log_{10}$ para coliformes totais, as demais apresentaram valores acima deste índice, chegando a $4,38 \log_{10}$ NMP/g. As quatro amostras mensais processadas,

apresentaram níveis de coliformes totais elevados durante todos os meses de coleta, sendo que nos meses de janeiro/2005 e março/2005 foram verificados valores mais elevados, de 4,38 \log_{10} NMP/g, e valores mais baixos foram obtidos no mês de setembro/2004 de 2,22 \log_{10} NMP/g (FIGURA 2).

Em geral, os produtos prontos para consumo não podem ser considerados livres de microrganismos. Durante o seu preparo, os vegetais inteiros são lavados, normalmente com água contendo cloro entre 50 e 200 ppm, e depois cortados e embalados. Enquanto a lavagem reduz o número de microrganismos, a operação de corte tem o potencial de recontaminar o produto. Além disso, os vegetais recém-cortados apresentam um índice de umidade mais elevado, maior quantidade de nutrientes simples e maior superfície de contato que os vegetais não-cortados, fazendo com que os produtos prontos para consumo se tornem mais suscetíveis ao crescimento de microrganismos (Jay, 2005). Os coliformes totais estão presentes em número elevado no presente estudo. Sua enumeração em água e alimentos tem menos impacto do que coliformes fecais ou o organismo indicador *E.coli*, porém sua presença em alimentos processados é considerada uma indicação de contaminação pós-sanitização ou pós-processamento (Silva et al., 1997).

Nos estudos de Kaneko et al. (1999), os vegetais crus apresentaram coliformes com valores $>2,0 \log$ UFC/g, com exceção de três amostras. Esses resultados diferem das nossas análises, mostrando que os coliformes totais tiveram uma média alta durante todo o período de coleta (3,31 \log_{10} UFC/g).

Por outro lado, Lopez et al. (2003) observaram 70% das amostras com NMP de coliformes $>1100/g$ ($3,04 \log_{10}$) UFC/g e 30% com níveis entre 11 ($1,04 \log_{10}$) e $1100/g$ ($3,04 \log_{10}$) em amostras de cebola e repolho prontas para consumo.

Dez, do total das 24 amostras analisadas foram positivas para coliformes fecais. Apenas os meses de novembro de 2004 e julho de 2005 apresentaram valores $<0,47 \log_{10}$ (FIGURA 2). Os valores médios de coliformes fecais variaram de $<0,47 \log_{10}$ NMP/g a $3,60 \log_{10}$ NMP/g. Índices acima do permitido (10^2 ou $2,0 \log_{10}$) foram observados em quatro amostras, três destas foram nos meses de janeiro e uma foi no mês de março de 2005 (FIGURA 2).

De acordo com o trabalho de Ruiz e colaboradores (1987), os maiores índices para os coliformes fecais foram encontrados nos meses de janeiro e março de 2005. Alguns fatores podem justificar esses índices, como o maior uso da água de irrigação contaminada e altas temperaturas favorecendo o desenvolvimento de microrganismos, em particular durante a primavera e o verão. Estes dados foram obtidos a partir de estudos em amostras oriundas de campos, mercados por atacado e pequenos estabelecimentos comerciais. Pode-se verificar que as temperaturas altas contribuíram para um maior crescimento bacteriano também nas amostras do presente estudo.

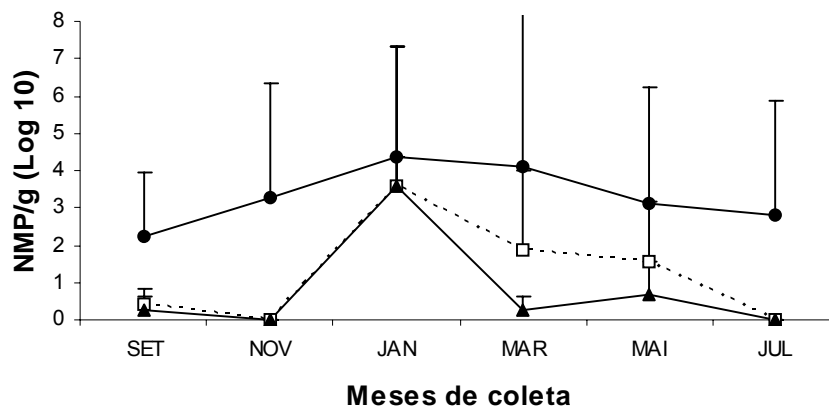


FIGURA 2 - Níveis bimestrais de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli* - NMP/g (Log₁₀) em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Porto Alegre-RS. Cada ponto representa a média de quatro amostras e o respectivo desvio padrão no período de setembro de 2004 a julho de 2005; onde coliformes totais foram (●); coliformes fecais (□) e *E. coli* (▲).

Das amostras analisadas, quatro foram classificadas como fora dos padrões microbiológicos sanitários para alimentos conforme estabelece a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A presença permitida de bactérias do grupo coliformes fecais é, no máximo, 10^2 NMP/g do alimento (BRASIL, 2001). Os níveis de coliformes fecais encontrados nas amostras do presente estudo indicam que os vegetais foram processados sob condições sanitárias insuficientes.

Escherichia coli foi encontrada em seis das amostras positivas para coliformes fecais com valores variando de $<0,47 \log_{10}$ até $3,60 \log_{10}$ NMP/g durante todo período (FIGURA 2). Os resultados do presente estudo foram similares aos de Nguz at al. (2005), onde *E.coli* foi detectada com valores de $0,6 \log_{10}$ até $3 \log_{10}$ UFC/g para vegetais mistos e grãos verdes. Os níveis de

E.coli são, às vezes, usados para o monitoramento das condições sanitárias sob as quais os alimentos são processados (Nguz et al., 2005). A detecção de *E. coli* nestas amostras demonstrou que houve contaminação de origem fecal e sua presença indica que as hortaliças avaliadas estão fora dos padrões exigidos para consumo humano.

Existe um aumento nas doenças transmitidas por alimentos em épocas de verão, que não está totalmente esclarecido. Frutas e vegetais frescos muito provavelmente estão incluídos nesta situação, visto que são consumidos em grandes quantidades durante os meses de verão (Beuchat, 1999).

Nos estudos de Ercolani (1976), foi observado que dentre os coliformes fecais, *Citrobacter* ocorreu com frequência mais elevada nas amostras de alface, durante o verão. Os resultados do presente estudo mostraram contagens microbianas mais elevadas na primavera e no verão, além de uma incidência muito maior dos níveis de coliformes fecais e *E. coli* nos meses mais quentes: janeiro e março (FIGURA 2), o que nos leva a prestar mais atenção na qualidade e segurança dos alimentos nestes períodos do ano.

A presença de *Klebsiella pneumoniae* pode ser usada como indicador de contaminação recente. Também a presença de *E. coli* indica potencial contaminação fecal e a predominância de *Staphylococcus aureus*

indica possível contaminação cruzada entre a preparação do alimento, as superfícies e o próprio alimento (Soriano et al., 2001).

Os isolados de *E.coli* obtidos no presente estudo e confirmados pelos testes IMVC foram enviados para FIOCRUZ para realização de provas sorológicas. Os resultados confirmaram a espécie *Escherichia coli* rugosa e quatro destes isolados foram identificados como *Klebsiella pneumoniae*. O teste de Indol apresenta resultado negativo para a enterobactéria *Klebsiella pneumoniae* e variável (positivo ou negativo) para *E. coli*. Os testes realizados mostraram a importância das provas bioquímicas e chamaram a atenção para presença de coliformes de origem não fecal.

Em estudo realizado por Abdul-Raouf et al. (1993), os fluídos celulares dos vegetais cortados em tiras ou fatias foram analisados e continham quantidades substanciais de açúcares simples e outros nutrientes que podem ser fermentados e utilizados pela *Escherichia coli* O157:H7. Conforme observado neste estudo, acredita-se que o processo de corte com subsequente liberação dos “sucos” celulares tem grande influência no crescimento bacteriano, mesmo após a sanitização do produto.

Um estudo realizado para avaliar, entre outros parâmetros, a sobrevivência e o crescimento de *E.coli* O157:H7, inoculada em alface cortada, pepino fatiado e cenoura em tiras mostrou que este microrganismo pode ser incluído como uma das várias bactérias patogênicas capazes de crescer em

saladas vegetais armazenadas em temperaturas de refrigeração de 12°C (Abdul-Raouf et al., 1993).

Outros trabalhos foram realizados para investigar as características de sobrevivência de *E.coli* O157:H7 em cenouras e cebolas, quando diferentes compostos de dejetos ou água de irrigação contaminada com o patógeno foram aplicados no solo dos campos usados para produção do vegetal. As descobertas deste estudo indicaram que *E.coli* O157:H7 pode ser transmitida através de dejetos animais para cenouras e cebolas num ambiente de produção agrícola (Islam et al., 2005). O microorganismo *E.coli* estava presente nas hortaliças do presente estudo, a fonte de contaminação não foi conhecida. Pode-se sugerir que a contaminação tenha ocorrido durante o processamento, entretanto o solo e água contaminada não podem ser subestimados. Com base nos dados de Islam et al. (2005), pode-se concluir que a manipulação imprópria dos dejetos pode levar à contaminação direta do produto e da água de suprimento, dos animais ou do homem.

Outros mecanismos interferem na deterioração que afeta os vegetais minimamente processados: a oxidação (escurecimento enzimático) e a perda da umidade, junto com o crescimento microbiano (Giménez et al., 2002).

4.2. Análises parasitológicas das hortaliças minimamente processadas

Os resultados das análises parasitológicas realizadas durante um período de 12 meses, entre os meses de setembro de 2004 até agosto do ano de 2005 estão representados na FIGURA 3. Das 48 amostras analisadas, 5 (10,41%) foram positivas para oocistos de *Eimeria* spp. A metodologia utilizada para a detecção de parasitos, empregou os métodos de Faust e Lutz, sendo encontrados oocistos na mesma proporção nas duas técnicas utilizadas, exceto no mês de julho de 2005, onde uma amostra foi positiva no método de Faust e outra no método de Lutz. Os meses do ano que apresentaram positividade para oocistos de *Eimeria* spp. foram setembro de 2004, abril, julho e agosto de 2005 (FIGURA 3). A maior frequência relativa de positividade (50%), foi no mês de julho de 2005, seguido dos meses de setembro/2004, abril e agosto de 2005 com 25% de amostras positivas. Nos demais meses do período não foram encontradas formas parasitárias de origem humana, nem animal (FIGURA 3).

Os oocistos encontrados pertencem ao gênero *Eimeria*, protozoários, parasitas de animais, que completam seu ciclo de vida em único hospedeiro. *Eimeria* spp. é um protozoário altamente hospedeiro-específico (Urquhart et al.1990).

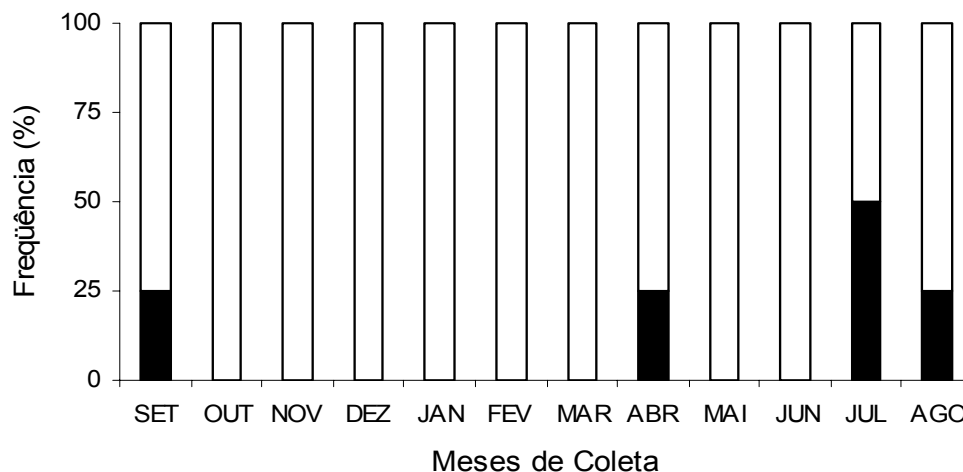


FIGURA 3 Distribuição da presença de *Eimeria* spp. em amostras de hortaliças minimamente processadas ao longo de um ano. O gráfico apresenta a frequência relativa de amostras, onde: (■) presença de parasitos e (□) ausência de parasitos

As coccidioses são doenças muito prevalentes em aves e podem ser encontradas numa variedade de condições climáticas e ambientais, podendo ser causadas pelas espécies de protozoários intra-celulares, pertencentes ao gênero *Eimeria*. As dinâmicas envolvidas na sobrevivência e transmissão dos parasitos não está ainda totalmente entendida (Waldensted et al., 2001). A presença de oocistos de *Eimeria* spp. no presente estudo, indica que houve contaminação por fezes de animais.

Uma das etapas do processamento mínimo dos vegetais prontos para consumo é a lavagem e/ou desinfecção com soluções antimicrobianas, geralmente utilizando o cloro (Francis et al., 1999). Oocistos de coccídios são altamente resistentes ao cloro e muitos outros desinfetantes químicos. A água de beber que é inadequadamente filtrada pode resultar numa infecção direta.

Fatores de risco são significantes e devem estar associados com doenças que incluem a fonte de água de beber, contato com animais e refeições com vegetais não lavados (Nimri, 2003).

Outros estudos também observaram procedimentos de desinfecção, Robertson e colaboradores em 2002, investigaram a qualidade de quatro diferentes brotos de sementes para analisar bactérias e parasitos, nestes produtos a desinfecção foi bem considerada, além do mais, se tratamentos de desinfecção eliminam ou diminuem a sobrevivência bacteriana, é improvável que sejam eficazes para *Cryptosporidium* e *Giardia*, que notoriamente são resistentes a uma gama de desinfetantes.

Na pesquisa realizada por Gelli et al. (1979), em hortaliças (alface, escarola, rúcula e agrião) comercializadas no município de São Paulo, os resultados foram: 5,3% e 59,29% de amostras positivas para *Strongyloides* e Ancilostomídeos, respectivamente. Estes dados são indicativos da presença de parasitas intestinais do homem ou de animais. No presente estudo não foram encontrados cistos e oocistos de protozoários ou ovos e larvas de helmintos que parasitam o homem.

Em estudo realizado por Nimri (2003), 200 amostras de fezes chegaram a quatro centros de saúde. Os pacientes tiveram gastroenterites numa área rural do Jordão, as amostras foram examinadas e oocistos de *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium* spp. foram encontrados na proporção de 6% e 8% respectivamente, sendo as crianças atingidas em maior

número. *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e outros enteroparasitos também foram observados. Os resultados refletem a sazonalidade natural da ciclosporidiose e da criptosporidiose, sendo maior na primavera. No presente estudo a sazonalidade também foi observada, mostrando que a maior frequência de oocistos de *Eimeria* spp. ocorreu nos meses mais frios (julho e agosto) com 25% de positividade. Nos meses de março, abril e maio foi observado 16,6% e na primavera (setembro, outubro e novembro) a frequência foi de 8,3% (TABELA 2), indicando que estações com uma frequência maior de oocistos, mostram uma relação de positividade com os meses de temperaturas mais baixas e com maior umidade.

Em pesquisa realizada no Instituto Nacional de Meteorologia do Rio Grande do Sul, na estação Porto Alegre, foi observado que a umidade relativa do ar nestes períodos foi de aproximadamente 80% e o período de chuvas acumulado foi de 170 mm, 150mm, 51mm e 160mm nos meses de setembro de 2004, abril de 2005, julho e agosto de 2005, respectivamente (INMET, 2006).

Provavelmente isto se explica pelo fato de que os oocistos têm maior viabilidade nestas condições, conforme verificado por Reyna et al. (1983) quando observou que oocistos de *Eimeria tenella* e *Eimeria acervulina* sobreviveram melhor em 40% de umidade com uma temperatura de 4°C. Quanto mais alta a umidade mais prolongada é a sobrevivência. Em temperaturas mais altas a sobrevivência era baixa.

TABELA 2: Freqüência relativa (%) da sazonalidade em relação à presença de parasitos em hortaliças minimamente processadas, comercializadas em Porto Alegre-RS no período de setembro de 2004 a agosto de 2005.

Estação	Análise Parasitológica		Amostras	Freqüência relativa (%)
	Presença	Ausência		
Primavera (set.out.nov.)	1	11	12	8,33
Verão (dez.jan.fev.)	0	12	12	0,00
Outono (mar.abr.mai.)	2	10	12	16,67
Inverno (jun.jul.ago)	3	9	12	25,00

No trabalho de Tavares e colaboradores (2005) observaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em alfaces servidas em 14 restaurantes “self-services” de Taubaté-SP. Na estação seca foi encontrada uma amostra positiva para oocistos de *Cryptosporidium* (7,15%), enquanto na estação úmida, foram encontrados quatro amostras positivas (28,58%). Estes resultados foram similares aos obtidos no presente estudo, principalmente em relação à freqüência maior de oocistos na estação do inverno.

No estudo de Robertson et al. (2002), oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram encontrados em 18 (10,5%) das 171 amostras analisadas, sendo as concentrações detectadas geralmente baixas. Contudo a ocorrência desses parasitos em brotos de sementes foi um indicativo de contaminação fecal. Na avaliação das hortaliças do presente estudo, para presença de parasitos encontrou-se oocistos de *Eimeria* spp, que são

parasitos exclusivos de animais, mostrando também uma contaminação de origem fecal.

Num estudo realizado com 73 amostras de hortaliças cruas higienizadas, servidas em restaurante universitário de Porto Alegre foram encontrados oocistos de *Eimeria* spp. em 29 amostras, além da presença de ovos de *Ascaris lumbricoides* em duas amostras e cistos de *Entamoeba coli* em uma das amostras (Maszlock, et al. 2005). Estes achados foram similares aos resultados do presente estudo em relação à presença de oocistos de *Eimeria* spp., porém as amostras não eram minimamente processadas, com atmosfera modificada. O estudo Maszlock, et al. (2005) mostrou que as hortaliças apresentaram contaminação fecal de origem animal e humana.

A análise estatística dos resultados do presente estudo revelou não haver correlação entre as contagens de mesófilos, psicotróficos, os níveis de coliformes, *E.coli* e a presença de parasitos ($p>0,05$). Isto poderia ser explicado pelo fato de que bactérias, principalmente as enterobactérias fazem parte da microbiota normal do intestino humano e de animais, entretanto parasitos (helmintos e protozoários) nem sempre estão presentes nestes locais, justificando assim a não correlação encontrada. A não correlação entre esses parâmetros também pode estar associada ao fato de que esses organismos procedem de diferentes fontes, principalmente os mesófilos e psicotróficos, que podem ser encontrados diretamente no solo e nos vegetais.

4.3. Análise de sujidades das hortaliças minimamente processadas

Das 28 amostras analisadas para sujidades a maioria apresentou alguma(s) das seguintes estruturas: fragmentos de insetos, insetos jovens, ácaros jovens, pulgão, artefatos e pequenos fragmentos de pedras. Também foram encontradas sujidades durante a análise parasitológica realizada pelos métodos descritos.

A freqüência relativa das sujidades encontradas nas hortaliças foi classificada em três níveis (FIGURA 4). Com o estudo verificou-se em todos os meses analisados a presença de sujidades num nível moderado e raro, exceto no mês de novembro que apresentou 25% das amostras com moderadas sujidades e 75% com nível abundante. O mês março /2005 apresentou 50% de sujidades em níveis raros e 50% em níveis moderados e o mês de julho de 2005, 25% de raras e 75% de moderadas sujidades (FIGURA 2). Estes resultados sugerem que existem falhas no processo de higienização das amostras. Comparando estatisticamente as contagens de microrganismos mesófilos e psicrótróficos, assim como os níveis de coliformes e *Escherichia coli* com a presença de sujidades em nossas amostras, não foi encontrada correlação ($p>0,05$).

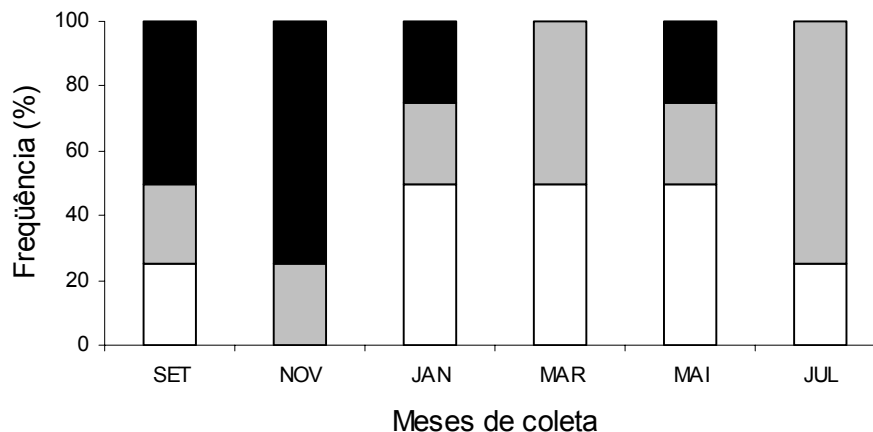


FIGURA 4. Distribuição bimestral de sujidades em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Porto Alegre, no período de setembro de 2004 a agosto de 2005. O gráfico apresenta a frequência relativa dos níveis raro (□), moderado (▒) e abundante (■) de sujidades.

A presença de sujidades nas amostras prontas para consumo, não indica necessariamente uma contaminação por microrganismos mesófilos e psicrotróficos, nem por coliformes e *E. coli*, significando que nem sempre as sujidades possam estar relacionadas com bactérias ou estar carreando estes microrganismos. As sujidades encontradas no presente estudo podem ter uma significância apenas estética, isto é, seus efeitos não afetariam a saúde do consumidor. Entretanto, às vezes sujidades podem causar agravos à saúde humana. Para um resultado mais conclusivo sobre os agravos que as sujidades encontradas, no presente trabalho poderiam causar, estas deveriam ser encaminhadas para estudos mais detalhados que demonstrem se são prejudiciais à saúde.

Para apoio destes estudos deve ser considerado o que consta na Resolução nº 175 sobre matéria prejudicial à saúde humana (Brasil, 2003).

Para adotar este procedimento devem ser utilizados os métodos de análise adotados e/ou recomendados pela Food and Drug Administration (FDA), pela Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), pela International Organization for Standardization (ISO), pelo Instituto Adolfo Lutz e pela Comissão do Codex Alimentarius e seus comitês específicos ou outros métodos adotados por entidades internacionalmente reconhecidas (Brasil, 2003). A conclusão dos resultados é feita após a análise das sujidades ou defeitos encontrados nas amostras, considerando o produto de acordo com a legislação, quando não apresentam matéria prejudicial à saúde ou impróprio para consumo humano quando apresentam matéria prejudicial à saúde, matéria deverá ser citada no resultado final.

5. CONCLUSÕES

Em relação aos resultados obtidos neste estudo realizado com hortaliças minimamente processadas comercializadas em supermercados de Porto Alegre, concluiu-se que as contagens de microrganismos mesófilos e psicotróficos encontraram-se elevadas, indicando uma alta carga bacteriana inicial e/ou falhas no processamento e armazenamento. Nas análises para coliformes fecais, quatro das hortaliças minimamente processadas analisadas apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pois as mesmas encontravam-se acima dos padrões permitidos pela legislação. As demais amostras, apresentaram em sua grande maioria, altas contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* foi encontrada em 6 das amostras positivas para coliformes fecais. Também foram encontradas cinco (10,4%) amostras positivas para parasitos de origem animal, onde oocistos de *Eimeria* spp. foram observados. Não foram encontrados parasitos de origem humana. Sujidades foram encontradas em grande parte das amostras. Todos resultados das análises bacteriológicas, parasitológicas e sujidades indicaram falhas no processo de higienização.

6. PERSPECTIVAS

1 Realizar análises microbiológicas e/ou parasitológicas para cada uma das etapas de uma planta de processamento de vegetais minimamente processados provenientes do mesmo produtor. Além do processamento, o solo e a água de irrigação também devem ser monitorados através de testes específicos para avaliar o grau de contaminação dos mesmos.

2 Realizar outras técnicas e metodologias para pesquisa de parasitos como: *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*, entre outros, em amostras de hortaliças prontas para consumo.

3 Pesquisar microorganismos como: *Shigella* sp. e *Salmonella* sp., que em pequena dose tornam-se infectantes e possam ser transmitidos por amostras de vegetais prontos para consumo e amostras de água de lavagem e de irrigação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RAOUF, U. M.; BEUCHAT, L. R.; AMMAR, M. S. Survival and Growth of *Escherichia coli* 0157:H7 on salad vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 7, p. 1999 -2006, 1993.

ALLENDE, A.; AGUAYO, E.; ARTÉS, F. Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, p. 109-117, 2004.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3rd ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

AYÇYÇEK, H.; SARIMEHMETOGLU, B.; ÇAKIROGLU, S. Assessment of microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. **Food Control**, Guildford, n.15, p. 379-384, 2004.

BABIC, I. et al. Changes in microbial populations on fresh cut spinach. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p. 107-119, 1996.

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

BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 59, p. 204 -216, 1996.

BHARATHI, S.; RAMESH, M. N.; VARADARAJ, M. C. Predicting the behavioural pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. **Food Control**, Guildford, v.12, p. 275-284, 2001.

BONILHA, P. R. M.; FALCÃO, D. P. Ocorrência de enteropatógenos em alfaces e suas águas de irrigação. **Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 5, p. 87-97, 1993/94.

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

BRANCO Jr, A. C.; WAIB, M. C.; FILHO, O. C. de O. Importância da higiene dos alimentos na epidemiologia das helmintoses - ocorrência de ovos de helmintos em hortaliças. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 3-4, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos**. 2. rev. Brasília, 1991/1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 mar. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 175, de 8 de julho de 2003**. Aprova o Regulamento técnico de avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/> Acesso em: 03 mar. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria Nº 518, de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/> Acesso em: 03 mar. 2006.

BRUGALLI, A.; PINTO, J. M.; TONDO, E. C. Análises de perigos e pontos críticos de controle para garantir a segurança alimentar em restaurante da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 72, p. 53-59, 2000.

BUCK, J. W.; WALCOTT, R. R.; BEUCHAT, L. R. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. **Plant Health Progress**. Plant

Management Network, 2003. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/safety/Buck.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2005.

CABRINI, K.T. et al. Pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 95, p. 92-94, 2002.

COELHO, L. M. P. da S. et al. Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 479-482, 2001.

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, p. 207– 227, 2005.

ERCOLANI, G. L. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, n. 6, p. 847-852, 1976.

ERDOĞRUL, Ö; ŞENER, H. The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolytica* cysts and *Giardia* cysts. **Food Control**, Guildford, v.15, p. 1-4, 2004.

FARBER, J. Microbiological issues surrounding the safety of fresh cut produce. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 10., Sydney, 1999. **Abstract Book**. Sydney, Australia, 1999. p.11.

FAUST, E. C. et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v.18, p.169-183,1938.

FDA-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **The Food Defect Action Levels**: level of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans. US Food and Drug Administration Center For Food Safety and Applied Nutrition. May 1995; revised May 1998. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/>. Acesso em: 24 mar. 2006.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre : Sulina, 1993. 606p.

FRANCIS G. A.; THOMAS C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Review article. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 34, p. 1-22, 1999.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 196 p.

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

GELLI, D. S. et al. Condições higiênico sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 39, p. 37-43, 1979.

GIMÉNEZ, M. et al. Relation between spoilage and microbiological quality in minimally processed artichoke packaged with different films. **Food Microbiology**, London, v. 20, p. 231-242, 2003.

GLEESON, E.; O'BEIRNE, D. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. **Food Control**, Guildford, v.16, p. 677-685, 2005.

GUIMARÃES, A. M. et al. Freqüência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.36, n.5, p. 621-623, 2003.

HILBORN, E. D. et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with consumption of mesclum lettuce. **Archives Internal Medicine**, Atlanta, v. 159, n. 15, p. 1758-64, 1999.

HOFFMAN, W.; A. PONS, J. A.; JANER J. L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal Public Health**, New York, v. 9, p. 281-298, 1934

HOUANG, E.; BODNARUK, P.; AHMET, Z. Hospital green salads and the effects of washing them. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 17, p.125-131, 1991.

HURST, W. C.; SCHULER, G. A. Fresh produce processing - an industry perspective. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 55, n. 10, p. 824-827, 1992.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. [Informações]. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/clima/tempo-callGraficos.html>>. Acesso em :24 de mar. 2006.

ISLAM, M. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Food Microbiology**, London, v.22, p. 63-70, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre : Artmed, 2005. 712p.

KANEKO, K. et al. Bacterial Contamination of Ready-to-Eat Foods and Fresh Products in Retail Shops and Food Factories. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 62, n.6, p. 644-649, 1999.

KAPER, J. B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Host-microbe interactions: bacteria **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.1, p.103 -108, 1998.

KELLEY, W. D. et al. **Agricultural Use of Sewage Sludge**: A Literature Review. Blacksburg : Virginia Water Resources Research Center, 1984. (Bulletin, 143)

LIN, C. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. Coli* O157:H7 in vegetable salads. **Food Control**, Guildford, v. 7, n. 3, p.135-140, 1996.

LÓPEZ, V. L.; ROMERO, R. J.; DUARTE, F. F. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pretrozados expendidos en Chile. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 53, n. 4, p. 383-388, 2003.

LUDWIG, K. M. et al. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 547-555, 1999.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 33, p. 219-224, 2001.

MANSFIELD, L. S.; GAJADHAR, A. A. *Cyclospora cayetanensis*, a food and waterborne coccidian parasite. Review. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.126, p.73-90, 2004.

MASZLOCK, V. et al. Análise parasitológica de hortaliças cruas oferecidas em restaurante universitário de Porto Alegre. **Revista da Sociedade Brasileira de**

Medicina Tropical, Rio de Janeiro, n.38, suplemento I, p.213, 2005. Trabalho apresentado no XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005, Florianópolis.

MESQUITA V. C. L. et al. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 363-366, 1999.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1982. 375p.

NASCIMENTO, M. S. et al. Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 66, n. 9, p.1697-1700, 2003.

NGUZ, K.; SHINDANO, J.; SAMAPUNDO, S.; HUYGHEBAGHEBAERT, A. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. **Food Control**, Guildford, v. 16, p. 623-628, 2005.

NIMRI, L. F. *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites associated with diarrhea in a rural area of Jordan. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 6, p. 131-135, 2003.

O'BEIRNE, D. Modified atmosphere packaging. In: GORMEY, T.R. (Ed.). **Chilled Foods**. The State of the Art. London : Elsevier Applied Science, 1990. p. 183 -199.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo - SP, Brasil. I - Pesquisa de helmintos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 4, 1992a.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo - SP, Brasil. II – Pesquisa de protozoários intestinais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 332-335, 1992b.

ORTEGA Y. R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 57, n. 6, p. 683-6, 1997.

PAULA, P. et al. Contaminação Microbiológica e Parasitológica em Alfaces (*Lactuca sativa*) de Restaurantes *self-service*, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 535-537, 2003.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

REYNA, P. S.; MCDUGALD, L.R.; MATHIS, G.F. Survival of coccidia in poultry litter and reservoirs of infection. **Avian diseases**, Kennett, v. 27, n. 2, p. 464-473, 1983.

ROBERTSON, L. J. et al. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 75, p. 119-126, 2002.

ROEVER, C. De. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. Review. **Food Control**, Guildford, v. 9, n. 6, p. 321-347, 1998.

ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P. Características Microbiológicas de Frutos e Hortaliças Minimamente Processados. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 84-92, 2000.

ROSE, J. B.; SLIFKO, T. R. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 62, n. 9, p.1059 -1070, 1999.

RUIZ, B., G.-V.; VARGAS, R. G.; GARCIA-VILLANOVA, R. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, p. 285-291, 1987.

SHUVAL, H. I.; YEKUTIEL, P.; FATTAL, B. Epidemiological evidence for helminth and cholera transmission by vegetables irrigated with wastewater: Jerusalem - a case study. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 17, p. 433-42, 1984.

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

SILVA Jr. et al. Observação das características sensoriais e determinação das contagens de *Eschechiria coli* e *Staphylococcus aureus* em amostras de vegetais quando submetidos à pressões reduzidas (vácuo) e baixos teores de oxigênio, em recipientes rígidos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 27-31,1994.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 317 p.

SIQUEIRA, I. M. C. et al. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da grande Belo Horizonte. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n. 49, p. 36-39, 1997.

SORIANO, J. M. et al. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. **Food Microbiology**, London, v.18, p. 159 - 163, 2001.

TAVARES, T.; ARAÚJO, A. J. U. S.; UENO, M. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em alfaces (*Lactuca sativa*) servidas em restaurantes "self-services" da cidade de Tambaaté-SP. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, volume 34, suplemento especial. Resumo apresentado no XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre.

TAKAYANAGUI, O. M. et al. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 37- 41, 2001.

THUNBERG, R. L. et al. Microbial Evaluation of Selected Fhesh Produce Obtained at Retail Markets. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 65, n. 4, p. 677-682. Research Note, 2002.

URQUHART, G. M. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro : Guanabara, 1990. 306 p.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 1998. 196p.

WALDENSTED, L. et al. Sporulation of *Eimeria máxima* oocysts in litter with different moisture contents. Environment and Health. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1412-1415, 2001.

8. APÊNDICES

8.1. Resultados das contagens de mesófilos e psicrotróficos (UFC/g) Log_{10} nas hortaliças minimamente processadas comercializadas em POA-RS.

Amostras	Mês / Anos	Mesófilos		Psicrotróficos	
		Média mensal	Coletas	Média mensal	Coletas
01	Setembro / 2004	7,80	7,15	7,81	7,72
02			7,51		8,28
03			8,30		7,04
04			6,91		6,65
05	Outubro / 2004	7,75	5,74	7,06	7,18
06			5,72		7,11
07			8,11		7,18
08			7,97		7,00
09	Novembro / 2004	6,41	6,79	7,70	7,52
10			5,23		7,93
11			6,41		7,48
12			6,18		7,72
13	Dezembro / 2004	7,43	6,46	8,35	8,04
14			7,08		8,11
15			7,15		8,76
16			7,90		7,86
17	Janeiro / 2005	8,08	8,08	8,44	8,53
18			7,99		8,46
19			8,40		8,66
20			7,00		6,81
21	Fevereiro / 2005	7,76	6,23	7,90	6,73
22			6,15		6,57
23			7,38		7,48
24			8,30		8,45
25	Março / 2005	8,21	6,56	8,41	7,82
26			8,62		8,82
27			8,34		8,57
28			6,43		6,30
29	Abril / 2005	7,64	6,00	8,19	< 5,00
30			7,18		7,56
31			6,23		7,52
32			8,20		8,74
33	Maio / 2005	6,11	5,80	7,83	7,60
34			6,49		8,23
35			6,20		7,74
36			< 3,00		6,86
37	Junho / 2005	6,30	6,83	7,45	7,90
38			5,78		7,04
39			5,75		6,67
40			5,58		7,28
41	Julho / 2005	5,68	5,76	6,90	6,62
42			5,26		6,56
43			5,62		7,20
44			5,86		6,89
45	Agosto / 2005	5,83	5,30	7,22	6,79
46			3,00		6,28
47			6,11		7,48
48			6,08		7,45

8.2. Resultados dos níveis de coliformes totais (CT), coliformes fecais (CF) e *Escherichia coli* (NMP/g) em Log₁₀ nas hortaliças minimamente processadas.

Mês/Ano	Amostra	CT	CF	<i>E. coli</i>
Setembro/2004	1	2.18	0.60	0.60
	2	2.32	0.60	<0.47
	3	2.32	<0.47	<0.47
	4	1.97	<0.47	<0.47
Novembro/2004	5	3.38	<0.47	<0.47
	6	3.38	<0.47	<0.47
	7	3.38	<0.47	<0.47
	8	2.15	<0.47	<0.47
Janeiro/2005	9	4.38	4.04	4.04
	10	4.38	2.63	2.63
	11	4.38	3.66	3.66
	12	4.38	<0.47	<0.47
Março/2005	13	2.20	<0.47	<0.47
	14	4.38	2.45	<0.47
	15	4.38	0.60	0.60
	16	3.30	1.18	<0.47
Maio/2005	17	1.92	<0.47	<0.47
	18	2.18	1.63	<0.47
	19	3.38	1.97	1.18
	20	3.38	<0.47	<0.47
Julho/2005	21	1.63	<0.47	<0.47
	22	<0.47	<0.47	<0.47
	23	3.38	<0.47	<0.47
	24	2.11	<0.47	<0.47

Resultados em negrito estão acima dos limites permitidos pela legislação (ANVISA RDC n° 12, 02/01/2001).

8.3 Resultados da análise parasitológica e de sujidades das hortaliças MP comercializadas em Porto Alegre-RS no período de setembro de 2004 a agosto de 2005.

Amostra	Mês	Análise Parasitológica		Análise de Sujidades
		M.Faust	M.Lutz	
1	Setembro / 2004	Aus.	Aus.	Fragmentos de insetos, inseto jovem e inteiro, ácaros jovens, fragmentos de pedras e fios coloridos
2		oocisto <i>Eimeria</i> spp.	oocisto <i>Eimeria</i> spp.	
3		Aus.	Aus.	
4		Aus.	Aus.	
5	Outubro / 2004	Aus.	Aus.	ND
6		Aus.	Aus.	
7		Aus.	Aus.	
8		Aus.	Aus.	
9	Novembro / 2004	Aus.	Aus.	Fragmentos de inseto, insetos inteiros, aracnídeo e sujeiras escuras
10		Aus.	Aus.	
11		Aus.	Aus.	
12		Aus.	Aus.	
13	Dezembro / 2004	Aus.	Aus.	ND
14		Aus.	Aus.	
15		Aus.	Aus.	
16		Aus.	Aus.	
17	Janeiro/ 2005	Aus.	Aus.	Patas de inseto, inseto jovem inteiro, exoesqueleto de artrópode
18		Aus.	Aus.	
19		Aus.	Aus.	
20		Aus.	Aus.	
21	Fevereiro /2005	Aus.	Aus.	ND
22		Aus.	Aus.	
23		Aus.	Aus.	
24		Aus.	Aus.	
25	Março/ 2005	Aus.	Aus.	Insetos jovens, fragmentos de pedras, sujeiras pretas
26		Aus.	Aus.	
27		Aus.	Aus.	
28		Aus.	Aus.	
29	Abril/ 2005	oocisto <i>Eimeria</i> spp.	oocisto <i>Eimeria</i> spp.	ND
30		Aus.	Aus.	
31		Aus.	Aus.	
32		Aus.	Aus.	
33	Maio/ 2005	Aus.	Aus.	Fragmento de inseto, inseto jovem, sujeiras pretas e artefatos
34		Aus.	Aus.	
35		Aus.	Aus.	
36		Aus.	Aus.	
37	Junho/ 2005	Aus.	Aus.	ND
38		Aus.	Aus.	
39		Aus.	Aus.	
40		Aus.	Aus.	
41	Julho/ 2005	Aus.	Aus.	Patas e asas de inseto, ácaro jovem, pulgão vivo, fragmentos de pedras
42		Aus.	Aus.	
43		Aus.	oocisto <i>Eimeria</i> spp.	
44		oocisto <i>Eimeria</i> spp.	Aus.	
45	Agosto/2005	Aus.	Aus.	ND
46		Aus.	Aus.	
47		oocisto <i>Eimeria</i> spp.	oocisto <i>Eimeria</i> spp.	
48		Aus.	Aus.	

ND: Não Determinado

8.4 Caldo VM/VP

Meio para teste bioquímico de Vermelho de Metila e Voges Proskauer

Peptona .	7,0g
Glicose	5,0g
Fosfato dipotássico -K ₂ HPO ₄	5,0g
Água destilada	1.000 mL

Dissolver os componentes em água destilada, distribuir 5mL em tubos e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

8.5 Cloreto de Sódio (0,9%)

Solução para ser usada na solução detergente.

Cloreto de Sódio	0,9 g
Água destilada	100 mL

Dissolver o cloreto do sódio em 100mL de água destilada, reservar.

8.6 Solução Detergente (0,5%)

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

Detergente neutro (detertec-7)	5 mL
Solução fisiológica (0,9%)	1000 mL

Diluir 5 mL do detergente em solução fisiológica de cloreto de sódio (0,9%).

8.7 Sulfato de Zinco (d=1,182g/mL)

Solução para ser utilizada no método de Faust.

Sulfato de zinco	33g
Água destilada	100mL

Diluir o sulfato de zinco em 100 mL de água destilada. Após a mistura utilizar o densímetro.

VITA

Silvia Regina Pavan da Silva

Filiação: Arduino Pavan e Lucinda Antoniazzi Pavan

Data de Nascimento: 18/02/61 Naturalidade: Bento Gonçalves/RS

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Pós-Graduação

Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente-Microbiologia dos Alimentos Faculdade de Agronomia-Universidade Federal do Rio Grande do Sul março de 2004 a abril 2006.

Especialização em Biologia Celular-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Março de 1989 a Dezembro de 1989.

Graduação

Licenciatura em Ciências - 1º grau - PUC/RS – 1980 a 1984.

Licenciatura Plena - Habilitação em Biologia - PUC/RS -1985 a 1988.

Ensino Médio 2º grau - Colégio Nossa Sra. Aparecida-Bento Gonçalves-RS de 1976 a 1978

Ensino Fundamental 1º Grau - Ginásio Pinto Bandeira: 1ª a 8ª série Pinto Bandeira distrito de Bento Gonçalves

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Abril de 1993 até o momento

Técnico de Laboratório/ Biologia -

UFRGS Porto Alegre-RS

Atuação:

Atividades em aulas práticas de parasitologia nos cursos de graduação.

Laboratório: exames parasitológicos, testes bacteriológicos.

Atividades de extensão e pesquisa

Representante Técnico Administrativo da COSAT-ICBS de 20/12/2001 a 20/12/2003.

Profa. convidada da disciplina de Química de Alimentos - Microscopia, enfoque em parasitologia. ano de 2002 e 2003 ICTA /UFRGS.

Ministrante da Oficina de Saúde Ambiental do Programa de Formação Continuada dos Trabalhadores da Saúde do RS 11/11 e 22/12 de 2002 ICBS.

Professora voluntária da disciplina de Ciências do Bloco de Ciências e Tecnologia do PEFJAT, março de 1999 até dezembro de 2002 PRORH/UFRGS.

Ministrante no Curso Básico de Técnicas de Laboratório Nível I de 10 a 14 de janeiro/2000 e Nível III de 03 a 23 de janeiro/2001 - PRORH/UFRGS.

Abril de 1990 a abril de 1993
RS bióloga - testes de bioensaios

Secretaria da Saúde e Meio Ambiente-
FEPAM/RS (Portaria de Cedência)