

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Ana Paula Maciel Pereira

**ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DE VEGETAIS MINIMAMENTE  
PROCESSADOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS ISOLADAS  
FRENTE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO E OZÔNIO**

São José do Rio Preto - SP

2010

**ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DE VEGETAIS MINIMAMENTE  
PROCESSADOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS ISOLADAS  
FRENTE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO E OZÔNIO**

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto - SP para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, linha de pesquisa: Microbiologia e Bioprocessos.

São José do Rio Preto - SP

2010

Pereira, Ana Paula Maciel.

Aspectos higiênico-sanitários de vegetais minimamente processados e perfil de resistência das leveduras isoladas frente ao hipoclorito de sódio e ozônio / Ana Paula Maciel Pereira. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

89 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Alimentos - Microbiologia. 3. Vegetais - Processamento - Microbiologia. 4. Leveduras - Perfil de resistência - Microbiologia. I. Hoffmann, Fernando Leite. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 663

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

**ANA PAULA MACIEL PEREIRA**

**ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DE VEGETAIS MINIMAMENTE  
PROCESSADOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS ISOLADAS  
FRENTE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO E OZÔNIO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto - SP.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann  
Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Membro titular da banca

---

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Membro titular da banca

---

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz  
Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Membro titular da banca

São José do Rio Preto - SP  
2010

*À toda minha família,  
especialmente aos meus pais, Ana  
Orozita Maciel Pereira e Lázaro  
Celso Pereira, meus **melhores**  
exemplos de força, persistência,  
respeito, humildade e amor.*

*Dedico.*

*Com todo meu carinho!*

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com intensidade, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve, e a vida é muito para ser insignificante. Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos”.*

*(Charles Chaplin)*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de São José do Rio Preto - SP.

## *Agradecimentos*

*Primeiramente agradeço aos meus pais, Ana e Lázaro, pelo apoio, incentivo, carinho, paciência, amor, e principalmente, por acreditarem em mim e estarem ao meu lado sempre.*

*À minha linda família, principalmente aos meus irmãos Lílíane e Celso, e primo João Carlos, pelo infinito apoio, força, companheirismo e carinho, imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.*

*Ao prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela oportunidade, orientação, aprendizado, paciência e constante ajuda mesmo nos momentos mais difíceis.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.*

*Aos professores Alexandre Rodrigo Coelho, Crispin Humberto García Cruz, Miyoko Jakabi e Roberto da Silva pela participação na banca examinadora e auxílio na correção deste trabalho.*

*À microempresa produtora de vegetais minimamente processados pela disponibilidade para a realização deste estudo.*

*Aos funcionários e professores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos pelo auxílio e amizade.*

*À minha amiga super companheira Catierine, pela constante ajuda na realização das análises laboratoriais, por me auxiliar em todos os momentos que precisei, pelos “cinemas de segunda-feira” e pelas risadas, tornando tudo mais divertido.*

*Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Jefferson, Malu e principalmente ao Juliano, pela ajuda na correção deste trabalho.*



*À Tânia, grande amiga, pelos ensinamentos e por me “socorrer” nos momentos em que mais precisei!*

*Ao Juliano Catalano, pessoa muito especial que vou levar no meu coração para sempre! Agradeço pela verdadeira amizade, carinho, força, compreensão e por ter aturado o que há de pior em mim. Muito obrigada por tudo!*

*Às minhas amigas Paula Correa, Priscila Samara e Ana Paula Fidêncio pelos momentos de descontração, gargalhadas, festinhas, brigadeiros, sessões de filmes e programas de índio.*

*Aos meus velhos e distantes amigos, principalmente à Renata Mundim e Thiago Costa, por torcerem por mim de uma forma inacreditável, pelo carinho enorme e por sempre estarem ao meu lado.*

*À Julyanna e André, pela grande amizade, paciência e constante auxílio em todos os momentos.*

*Aos meus amigos e colegas de mestrado, Alessandra, Aline De Grandi, Aline Teodoro, Angela, Carol, Catharina, Janaína, Juliana, Jupyracyara, Letícia, Lina, Luana, Sabrina, Raquel e Vidiany.*

*À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada!*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>03</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>04</b>
3.1. Processamento mínimo de vegetais .....	04
3.2. Agentes sanitizantes .....	08
3.2.1. Hipoclorito de sódio .....	09
3.2.2. Ozônio .....	10
3.3. Qualidade higiênico-sanitária .....	11
3.4. Bioindicadores de contaminação em vegetais minimamente processados .....	13
3.4.1. Bolores e leveduras .....	13
3.4.2. Bactérias do grupo coliforme .....	14
3.4.3. <i>Salmonella</i> spp. ....	15
3.5. Boas práticas de fabricação (BPF) .....	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
4.1. Obtenção das amostras .....	18
4.2. Preparo das amostras .....	18
4.3. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas .....	19
4.4. Enumeração de bolores e leveduras .....	19
4.5. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais .....	20
4.6. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes .....	20
4.7. Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> .....	20
4.8. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	20
4.9. Isolamento das culturas de leveduras .....	21
4.10. Provas taxonômicas .....	21
4.11. Provas morfológicas .....	22
4.12. Provas fisiológicas .....	22
4.12.1. Capacidade fermentativa .....	22

4.12.2. Desenvolvimento em diversas temperaturas .....	23
4.12.3. Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato .....	23
4.12.4. Resistência à pressão osmótica .....	23
4.12.5. Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione) .....	24
4.12.6. Síntese de amido .....	24
4.12.7. Provas de assimilação de fontes de carbono .....	24
4.13. Ensaio de resistência aos sanitizantes hipoclorito de sódio e ozônio .....	25
4.14. Técnica de <i>Replica-plate</i> .....	25
4.15. Aplicação do formulário <i>check-list</i> .....	26
4.16. Delineamento experimental .....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
5.1. Análises microbiológicas .....	30
5.1.1. Água .....	30
5.1.2. Vegetais minimamente processados .....	32
5.2. Formulário <i>check-list</i> : análise das BPF .....	38
5.3. Identificação das leveduras .....	49
5.4. Ensaio de resistência ao hipoclorito de sódio e ozônio .....	58
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>77</b>
ANEXO A - Lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos .....	77

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fluxograma básico para o processamento mínimo de frutas e hortaliças.....	<b>05</b>
<b>Figura 2.</b> Fórmula para o cálculo da pontuação de cada bloco.....	<b>27</b>
<b>Figura 3.</b> Resultado geral do <i>check-list</i> inicial (i) e <i>check-list</i> final (f) aplicados na microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP, quanto a critérios de conformidade.....	<b>39</b>
<b>Figura 4.</b> Análise de conformidade dos <i>check-list</i> inicial (i) e final (f) para os blocos referentes à edificações e instalações (B1); equipamentos, móveis e utensílios (B2); manipuladores (B3); produção e transporte de alimentos (B4) e documentação (B5) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.....	<b>41</b>
<b>Figura 5.</b> Análise de conformidade para o bloco 1 dos <i>check-list</i> inicial (i) e final (f) - edificações e instalações: área externa (a); acesso (b); área interna (c); piso (d); tetos (e); paredes e divisórias (f); portas (g); janelas e demais aberturas (h); escadas, elevadores de serviço e estruturas auxiliares (i); instalações sanitárias e vestiários para os manipuladores (j); instalações sanitárias para visitantes e outros (k); lavatórios na área de produção (l); iluminação e instalação elétrica (m); ventilação e climatização (n); higienização das instalações (o); controle integrado de vetores e pragas urbanas (p); abastecimento de água (q); manejo de resíduos (r); esgotamento de água (s); e “layout” (t) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.....	<b>42</b>
<b>Figura 6.</b> Análise de conformidades para o bloco 2 dos <i>check-list</i> inicial (i) e final (f) - equipamentos, móveis e utensílios: equipamentos (a); móveis (b); utensílios (c); higienização de equipamentos e utensílios (d) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.....	<b>44</b>
<b>Figura 7.</b> Análise de conformidades para o bloco 3 dos <i>check-list</i> inicial (i) e final (f) - manipuladores: vestuários (a); hábitos higiênicos (b); estado de saúde (c); assistência à saúde (d); equipamentos de proteção individual (e); programa de capacitação dos	

manipuladores e supervisão (f) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP..... **45**

**Figura 8.** Análise de conformidades para o bloco 4 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - produção e transporte de alimentos: matéria-prima, ingredientes e embalagens (a); fluxo de produção (b); rotulagem e armazenamento do produto final (c); controle de qualidade do produto final (d); transporte do produto final (e) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP..... **46**

**Figura 9.** Análise de conformidade para o bloco 5 dos *check-list* inicial (i) e final - documentação: manual de BPF (a); Procedimentos Operacionais Padronizados (b) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP..... **48**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Notas e critérios direcionados ao diagnóstico da linha de processamento.....	<b>26</b>
<b>Tabela 2.</b> Constante K característica para cada bloco avaliado.....	<b>27</b>
<b>Tabela 3.</b> Pesos específicos para a aplicação na equação da Figura 2.....	<b>28</b>
<b>Tabela 4.</b> Classificação higiênico-sanitária para a microempresa.....	<b>28</b>
<b>Tabela 5.</b> Resultados das análises microbiológicas efetuadas nas amostras de água.....	<b>31</b>
<b>Tabela 6.</b> Resultados das análises microbiológicas nas amostras de acelga, cenoura, couve, milho e vagem, após o processamento ( $t_0$ ) e com sete dias após a data de fabricação ( $t_7$ ).....	<b>33</b>
<b>Tabela 7.</b> Resultados das análises microbiológicas nas amostras de quiabo, repolho, abóbora e couve-flor, após o processamento ( $t_0$ ) e com sete dias após a data de fabricação ( $t_7$ ).....	<b>34</b>
<b>Tabela 8.</b> Distribuição das leveduras segunda a origem.....	<b>50</b>
<b>Tabela 9.</b> Frequência relativa das três espécies de leveduras isoladas.....	<b>51</b>
<b>Tabela 10.</b> Resultado dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação das leveduras isoladas.....	<b>52</b>

## RESUMO

A demanda por dietas saudáveis, a participação feminina cada vez maior no mercado de trabalho, reduzindo o tempo gasto no preparo das refeições e a praticidade cada vez mais exigida pelas redes de fast-food e restaurantes, resultaram em uma expansão no setor de vegetais minimamente processados. O objetivo do processamento mínimo é oferecer ao consumidor, frutas e hortaliças prontas para o preparo/consumo, ou seja, alimentos práticos, que economizam tempo, espaço e mão-de-obra. Além disso, devem apresentar características de produto fresco, boa aparência, qualidade nutritiva e segurança para o consumidor. Devido ao alto teor de umidade, à intensa manipulação e à falhas que podem ocorrer durante as etapas do processamento, esse produto alimentício geralmente constitui um ótimo meio para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo analisar os aspectos higiênico-sanitários de vegetais minimamente processados produzidos por uma microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP, por meio do monitoramento microbiológico e aplicação do *check-list*, e também verificar o perfil de resistência das leveduras isoladas frente ao hipoclorito de sódio e ozônio em diferentes concentrações. Foram realizadas coletas de amostras de água, abóbora, acelga, cenoura, couve, couve-flor, milho, quiabo, repolho e vagem, nas quais foi avaliada a qualidade microbiológica por meio da determinação do Número Mais Provável (NMP) para coliformes totais e termotolerantes, contagem de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi efetuada apenas nas amostras de água. As análises microbiológicas foram realizadas no dia do processamento dos vegetais ( $t_0$ ) e com 7 dias de fabricação ( $t_7$ ). A partir da enumeração de bolores e leveduras, foram isoladas após 5 dias de incubação a 25°C, 47 culturas de leveduras de todos os tipos morfológicos existentes, as quais foram submetidas às provas taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e assimilação de diversas fontes de carbono para identificação. Quanto à verificação das BPF, na avaliação final, a microempresa apresentou importante melhora quanto aos critérios de conformidade, recebendo a classificação como muito bom. Nenhuma amostra de água apresentou resultados fora do recomendado pela legislação para aeróbios mesófilos e bactérias do grupo coliforme. Dentre as amostras de vegetais, 38 % apresentou valores elevados (1100 e >1100) para coliformes totais. Os resultados para coliformes termotolerantes de todas as amostras (100%) encontraram-se de acordo com a legislação vigente, assim como para *Salmonella* spp. A ocorrência de *Escherichia coli* foi confirmada em 13 % das amostras. Embora a legislação federal não estabeleça padrão para bolores e leveduras, as amostras apresentaram elevadas contagens desses microrganismos. Das 47 leveduras, 40 (85,1 %) correspondem à *Cryptococcus laurentii*, 6 (12,8 %) à *Arxula adeninovorans* e 1 (2,1 %) à *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. Todas as leveduras apresentaram resistência aos sanitizantes hipoclorito de sódio e ozônio em todas as concentrações testadas. Diante destas observações, as adequações quanto às BPF realizadas na microempresa foram responsáveis pela melhoria na qualidade microbiológica dos produtos, porém, a resistência das leveduras aos sanitizantes utilizados é um fator preocupante, pois tais microrganismos são deteriorantes e comprometem a vida útil dos vegetais.

**Palavras chave:** Vegetais minimamente processados; qualidade microbiológica; BPF; hipoclorito de sódio; ozônio.

## ABSTRACT

The demand for healthy diets, the larger and larger feminine participation in the job market, reducing the time spent in the preparation of meals, joined to the practicality more and more demanded by the fast-food nets and restaurants, resulted in an expansion in the section of minimally processed vegetables. The minimum processing's objective is to offer fruits and vegetables ready for preparing / consuming to the consumer, in other words, practical foods, that save time, space and labor. Besides, they must present characteristics of fresh products, good appearance, nutritious quality and safety for the consumer. Due to the high humidity tenor, to the intense manipulation and to flaws that can happen during the processing stages, this food product usually constitutes a great environment for development of deteriorative or pathogenic microorganisms. According to the presented, this work aimed to analyze the hygienic-sanitary aspects of minimally processed vegetables produced by a micro company located in São José do Rio Preto - SP, by microbiological monitoring and *check list* use, verifying as well as the resistance profile of yeasts isolated in front of sodium hypochlorite and ozone. Samples of water, pumpkin, beet, carrot, collard green, cauliflower, corn, okra, cabbage and green bean were collected, in which the microbiological quality was evaluated through the determination of the Most Probable Number (MPN) for total and thermotolerant coliforms, mesophilic aerobic bacteria counting, molds and yeasts and *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. research. The mesophilic aerobic bacteria counting was made only in the samples of water. The microbiological analyses were accomplished at the day of the vegetables' processing ( $t_0$ ) and after 7 days of fabrication ( $t_7$ ). From the molds and yeasts enumeration, 47 yeast cultures of all the existent morphological types were isolated after 5 days of incubation at 25°C, which were submitted to taxonomic, morphologic and physiologic tests, and assimilation of several sources of carbon for identification. About the Good Manufacturing Practices (GMP) verification, in the final evaluation, the micro company presented an important improvement relative to the conformity criteria, receiving the classification as very good. No sample of water presented results out of the recommended by the legislation for mesophilic aerobic bacteria and bacteria from the coliform group. Among the samples of vegetables, 38% of the samples presented high values (1100 and >1100) for total coliforms. The results for thermotolerant coliforms from all of the samples (100%) were in agreement with the effective legislation, as well as for *Salmonella* sp. The occurrence of *Escherichia coli* was confirmed in 13% of the samples. Although the federal legislation does not establish standards for molds and yeasts, the samples presented high countings of these microorganisms. From the 47 yeasts, 40 (85.1%) correspond to *Cryptococcus laurentii*, 6 (12.8%) to *Arxula adeninovorans* and 1 (2.1%) to *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. All of the yeasts presented resistance to the sanitizers sodium hypochlorite and ozone in all of the concentrations tested. In face of these observations, the adaptations related to GMP accomplished in the micro company were responsible for improving the products' microbiological quality, however, the resistance of the yeasts to the sanitizers used is a preoccupying factor, because such microorganisms are deteriorative and jeopardize the vegetables' useful life.

**Key Words:** Minimally processed vegetables; microbiological quality; GMP; sodium hypochlorite, ozone.



## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As exigências do mercado consumidor não envolvem apenas a busca por alimentos saudáveis, mas também por aqueles de maior praticidade e conveniência no manuseio, o que têm levado ao desenvolvimento de novas tecnologias, dentre as quais, destaca-se o processamento mínimo de vegetais.

Os vegetais minimamente processados surgiram há aproximadamente 30 anos nos Estados Unidos da América (EUA), e desde então vem ganhando grande espaço no mercado. No Brasil, tal tecnologia foi introduzida somente na década de 90, devido ao crescimento da demanda de produtos considerados de conveniência ou de fácil preparo.

As frutas e hortaliças minimamente processadas são definidas como produtos *in natura*, selecionados, lavados, descascados, cortados, sanitizados, embalados e refrigerados, tornando-se prontos para o preparo e/ou consumo.

Procurando assegurar a saúde do consumidor, tais produtos devem apresentar qualidade microbiológica, a qual depende da microbiota presente na matéria-prima, condições em que cada etapa do processo foi efetuada e armazenamento do produto.

Procedimentos como cortes ou injúrias no tecido vegetal aumentam a superfície exposta provocando alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas. Desta forma, o metabolismo do vegetal também pode propiciar a contaminação microbiana. Outros fatores como a água de lavagem, manipuladores, equipamentos, utensílios, tipo de embalagem e temperatura de estocagem podem contribuir para o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

A água utilizada na lavagem dos vegetais é de grande importância para a garantia da segurança do alimento, pois em condições sanitárias insatisfatórias, pode se tornar fonte de contaminação primária durante o processamento. A adição de antimicrobianos nessa água

pode melhorar sua eficiência, reduzindo o risco de desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos.

Dentre algumas soluções desinfetantes, a mais utilizada é o cloro, em suas várias formas. O hipoclorito de sódio é o sanitizante mais empregado devido a sua rápida ação, fácil aplicação e completa dissociação em água, porém em elevadas concentrações pode ocasionar descoloração em alguns produtos.

O gás ozônio é um antimicrobiano pouco utilizado no Brasil, embora seja eficiente e considerado mais seguro do que os demais sanitizantes comumente utilizados pela indústria de alimentos. Por esta razão, produtores de vegetais minimamente processados vem substituindo o hipoclorito de sódio por tal sanitizante.

Portanto, o processamento mínimo objetiva oferecer ao consumidor produtos práticos, semelhantes aos frescos e com vida útil relativamente prolongada, mantendo sua qualidade nutritiva e ainda proporcionando inocuidade do ponto de vista microbiológico.

O consumo de vegetais minimamente processados vem crescendo nos últimos anos, e conseqüentemente, o número de produtores deste alimento tem aumentado consideravelmente. Como frutas e hortaliças minimamente processadas propiciam o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, a falta de informações necessárias relacionadas às Boas Práticas de Fabricação (BPF) compromete a qualidade do produto. Conforme o exposto torna-se necessária a avaliação da qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados produzidos por uma microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP e da água utilizada no processamento.

## 2. OBJETIVOS

Diante do contexto, este trabalho teve por objetivos:

- Analisar as condições higiênico-sanitárias de amostras de vegetais minimamente processados, por meio de análises microbiológicas baseadas na legislação brasileira vigente, assim como a enumeração de bolores e leveduras;
- Verificar a qualidade microbiológica da água utilizada pela microempresa no processamento;
- Avaliar as BPF da microempresa, por meio da aplicação do formulário *check-list*;
- Isolar e identificar as leveduras presentes nos produtos a serem comercializados;
- Verificar a resistência das isoladas frente ao hipoclorito de sódio nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm, e ao ozônio nas concentrações de 0,25 e 0,50 ppm.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

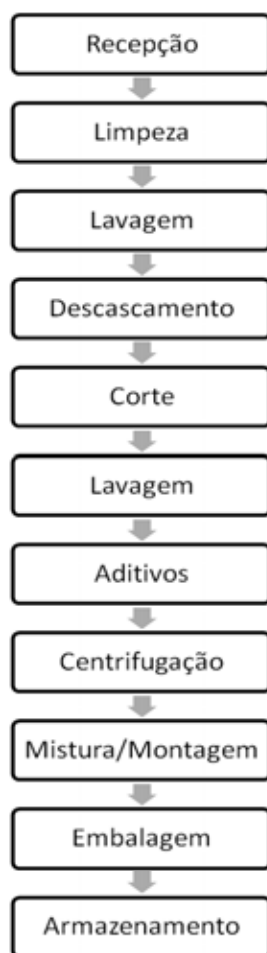
#### **3.1. Processamento mínimo de vegetais**

Processamento mínimo é definido como uma tecnologia de conservação que provoca pequenas alterações nas condições naturais do alimento, visando à permanência das características sensoriais e nutritivas do produto fresco (WILEY, 1994; FELLOWS, 2006).

A produção de frutas e hortaliças minimamente processadas ocorre em diversas etapas, desde a colheita até a comercialização (Figura 1). Estas podem variar de acordo com o tipo de produto processado (DAMASCENO; STAMFORD; ALVES, 2001).

Ainda no campo, ocorre eliminação dos vegetais defeituosos e da contaminação grosseira; as frutas e hortaliças são separadas de acordo com a firmeza, ausência de defeitos e maturação e, posteriormente são armazenadas sob refrigeração (CHITARRA, 1998; SILVA; GUERRA, 2003).

Durante o transporte são indispensáveis o carregamento correto e a utilização de embalagens adequadas, pois esses fatores interferem diretamente na preservação dos vegetais, podendo provocar perdas causadas por danos físicos ou biológicos. Caixas de madeira e de papelão ondulado são exemplos de embalagens que devem ser utilizadas, por apresentarem boa resistência mecânica. Quando o transporte é considerado longo, o ideal é que as frutas e hortaliças sejam transportadas sob baixas temperaturas (CHITARRA; CHITARRA, 2005; FURLANETO; SANTINI; VELASCO, 2005).



**Figura 1.** Fluxograma básico para o processamento mínimo de frutas e hortaliças (OKURA; MARIANO; TEIXEIRA, 2006).

Na recepção dos vegetais na indústria, estes são novamente classificados de acordo com sua qualidade e tamanho e, posteriormente seguem para a etapa de lavagem, a qual consiste em eliminar material estranho, galhos, sujidades, terra, ramos, areia, insetos, pesticidas e resíduos de fertilizantes. Em seguida, é efetuada a sanitização, por meio de banho de imersão em água clorada, a qual elimina a maioria dos microrganismos. Este procedimento tem duração de cerca de 10 a 15 minutos, com agitação ou não e posterior centrifugação. A etapa de sanitização poderá vir anterior ou posteriormente ao descascamento e corte (AGUILA et al., 2006; PIRES et al., 2006; PEREZ et al., 2008).

Os manipuladores devem utilizar uniformes apropriados de cor clara e equipamentos de proteção individual como botas, aventais, luvas, máscaras e toucas, bem como apresentar bom asseio pessoal e hábitos higiênicos durante o manuseio dos alimentos (VITTI et al., 2004a).

O descascamento manual, além de lento, provoca desperdício, portanto o ideal é que este procedimento seja realizado de outras formas, utilizando vapor ou água quente, vapor com pressão elevada ou de forma mecânica. O corte, procurando obter tamanhos uniformes, pode ser realizado manual ou mecanicamente. Este, aumenta a superfície exposta e a taxa de respiração do vegetal, o qual se torna mais susceptível à contaminação microbiana e à outras alterações indesejáveis (CHITARRA, 1998; TEIXEIRA et al., 2001; FANTUZZI; PUSCHMANN; VANETTI, 2004).

Sasaki et al. (2006) e Pineli et al. (2005) afirmam que como consequência do corte, o rompimento de organelas celulares altera a permeabilidade da membrana, causando uma desorganização celular e ativando a produção de etileno, o qual contribui para a síntese de enzimas responsáveis por alterações fisiológicas e bioquímicas, como o escurecimento enzimático, provocando perdas nutricionais.

Quanto mais fatiado for o tecido vegetal, maior será a superfície exposta e a taxa de respiração, conseqüentemente serão maiores as alterações e a perecibilidade do alimento (PORTE; MAIA, 2001).

Diversos tipos de embalagens para frutas e hortaliças minimamente processadas vem sendo estudadas e testadas em vários países, o que tem apresentado grandes avanços ao longo dos últimos anos. Tipos de materiais, formato de embalagens e misturas gasosas contendo diferentes concentrações de oxigênio e gás carbônico, estão sendo avaliadas para a obtenção de uma maior conservação desse tipo de alimento (BEERLI; BOAS; PICCOLI, 2004; MORETTI, 2007).

Plásticos simples ou filmes poliméricos são muito utilizados como embalagens, pois estes são capazes de manipular de forma moderada a atmosfera ao seu redor. Também são utilizadas embalagens de polietileno tereftalato (PET), poliestireno (PS) e policloreto de vinila (PVC), sendo que este último é empregado na produção de filmes, os quais apresentam uma alta taxa de permeabilidade ao oxigênio e dióxido de carbono (ROVERSI; MASSON, 2005; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A conservação em temperaturas apropriadas e o uso de embalagens que manipulam a concentração de gases na atmosfera são as maneiras mais eficazes no aumento da vida útil do produto. Por se tratar de um alimento altamente perecível quando comparado com aquele que lhe deu origem, a temperatura ideal de armazenamento é de 5°C. O controle da atmosfera no armazenamento pode reduzir a taxa de respiração dos vegetais, minimizando o risco de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e de escurecimento enzimático (ROSA; CARVALHO, 2004; RINALDI; BENEDETTI; CALORE, 2005).

A refrigeração, empregada na preservação de alimentos considerados frescos, consiste em um dos métodos mais brandos de conservação. A temperatura baixa reduz consideravelmente a velocidade das reações químicas e enzimáticas, além de deter o crescimento de microrganismos termófilos e mesófilos, permitindo desta forma, o controle da qualidade do produto (ORDOÑEZ et al., 2005; FELLOWS, 2006).

Segundo os mesmos autores, a temperatura de refrigeração de frutas e hortaliças requer maior atenção, pois a exposição destas à temperaturas inferiores a ideal, pode provocar um tipo de alteração denominada dano pelo frio, a qual pode se manifestar de diferentes formas. Os vegetais podem apresentar escurecimento interno ou externo, danos mecânicos e manchas na casca ou apodrecimento.

Conforme Fantuzzi; Pushmann; Vanetti (2004) e Zacari et al. (2007) a vida de prateleira dos vegetais minimamente processados difere de acordo com o tipo do produto, apresentando

uma variação média de 7 a 20 dias, quando o armazenamento é efetuado em temperaturas adequadas.

Tratamentos térmicos brandos seguidos de resfriamento rápido, conservação com gases, atmosfera modificada, refrigeração e o uso de substâncias acidificantes, antioxidantes e antimicrobianas, são métodos que podem ser utilizados visando estender a vida útil desse alimento (SEABRA et al., 2001; OKURA; MARIANO; TEIXEIRA, 2006).

### **3.2. Agentes sanitizantes**

Sanitizantes são conservantes químicos capazes de eliminar ou reduzir a população microbiana. Estes agentes atuam sobre as formas vegetativas, mas não necessariamente sobre as formas esporuladas de microrganismos patogênicos. A sua utilização depende da concentração, solubilidade, temperatura, tempo, pH, quantidade e espécie de microrganismos presentes (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Na área de higienização de alimentos, diversas substâncias com ação antimicrobiana podem ser utilizadas, entre elas, soluções à base de cloro, compostos quaternários de amônia, ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, láctico, peracético, entre outros (BERBARI; PASCHOALINO; SILVEIRA, 2001).

Conforme Chitarra (1998) e Aguila et al. (2006) conservantes químicos podem ser utilizados para aumentar a vida de prateleira de vegetais minimamente processados, e seu uso deve melhorar alguns fatores de qualidade sem prejudicar outros. Além disso, é indispensável que a água de lavagem, onde o sanificante foi adicionado, seja de boa qualidade microbiológica, uma vez que essa etapa é responsável por reduzir a carga microbiana inicial visando a obtenção de produtos microbiologicamente mais seguros.



### 3.2.1. Hipoclorito de sódio

Os produtos clorados compreendem o grupo dos compostos sanitizantes mais utilizados, seja na forma de gás cloro, hipoclorito de cálcio ou sódio, produtos liberadores de cloro como dicloroisocianureto de sódio ou potássio; todos apresentando boa eficiência e baixo custo (FERREIRA et al., 2003; SREBERNICH, 2007; ZACARI et al., 2007).

O único sanitizante permitido pela legislação brasileira em produtos minimamente processados é o hipoclorito de sódio e, este vem sendo utilizado para a manutenção da qualidade microbiológica de diversos produtos, como os vegetais minimamente processados (CHITARRA, 1998; MORETTI, 2007).

A ação germicida dos compostos à base de cloro se deve ao fato da sua reação com as proteínas da membrana das células microbianas, alterando o transporte de nutrientes e ocasionando a perda de componentes celulares. Também apresentam poder de hidrólise de compostos fenólicos, reduzindo a probabilidade de formação de sabores e odores desagradáveis (ANTONIOLLI et al., 2005).

Conforme mencionado por diversos autores (OLIVEIRA; VALLE, 2000; DELAQUIS et al., 2004; FURLANETO; SANTINI; VELASCO, 2005; LUND et al., 2005) na sanitização de vegetais submetidos ao processamento mínimo são recomendadas concentrações de cloro entre 50 e 200 ppm, em pH entre 5 e 7, com duração de 3 a 20 minutos. A utilização de concentrações mais elevadas pode promover alterações na coloração dos vegetais, além de provocar corrosão nos equipamentos utilizados.

Dentre as vantagens do uso de compostos à base de cloro, destacam-se o seu largo espectro bacteriano e a inalterabilidade de sua eficiência quando presente em águas duras. Como desvantagens pode-se mencionar a alteração do aroma de frutas e pouca eficácia em pH elevado (EVANGELISTA, 2005).

Segundo Srebernich (2007) o uso deste sanitizante vem gerando certa preocupação, pois este é considerado precursor na formação de cloraminas orgânicas prejudiciais à saúde, por apresentar alto potencial carcinogênico. Por essa razão, diversos agentes sanitizantes, como o peróxido de hidrogênio, ácido cítrico e ácido ascórbico, vêm sendo propostos como substitutos do hipoclorito de sódio no processamento mínimo de frutas e hortaliças (BEERLI; BOAS; PICCOLI, 2004; OKURA; MARIANO; TEIXEIRA, 2006).

### 3.2.2. Ozônio

O ozônio é um gás atmosférico utilizado para evitar contaminação visando prolongar a vida de prateleira de alguns alimentos. Apresenta eficácia diante um grande número de microrganismos, retardando o crescimento de bolores, leveduras e bactérias em pequenas concentrações (3 ppm) em temperatura de refrigeração (EVANGELISTA, 2005; JAY, 2005).

No Brasil o ozônio não tem sido muito empregado, mas este antimicrobiano é bastante utilizado na Europa e nos EUA desde o final do século XIX, no tratamento de água para abastecimento público (MONDARDO; SENS; MELO FILHO, 2006; PASCHOALATO; TRIMAILOVAS; BERNARDO, 2008).

Conforme Lanita; Silva (2008) a aplicação do ozônio no processamento de alimentos é recente, pois somente no ano de 2001, nos EUA, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a sua utilização. Ainda não há no Brasil uma legislação específica sobre o emprego do mesmo.

Devido à resistência apresentada por alguns microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos, o interesse por novos processos de sanitização na indústria alimentícia está aumentando. O ozônio vem ganhando destaque por ser mais seguro do que os desinfetantes mais comuns, pois não deixa resíduos tóxicos capazes de alterar características como sabor e

odor (CARDOSO et al., 2003).

Segundo Evangelista (2005) o gás ozônio é um forte agente oxidante, portanto não deve ser utilizado em alimentos com altos teores de lipídeos, pois pode provocar um aumento na rancidez do produto.

Dentre as diversas aplicações do ozônio na indústria de alimentos, destaca-se a desinfecção de embalagens, o combate à biofilmes microbianos aderidos nas superfícies dos equipamentos e o tratamento de frutas e hortaliças visando o aumento de sua vida útil (LANITA; SILVA, 2008).

### **3.3. Qualidade higiênico-sanitária**

Frutas e hortaliças minimamente processadas são mais perecíveis do que àquelas intactas da mesma variedade, visto que o processamento altera a integridade dos tecidos do produto. Além do desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes, reações de escurecimento, perda da firmeza e formação de metabólitos secundários são algumas consequências de tal alteração (MELLO et al., 2003; ROSA; CARVALHO, 2004).

A microbiota é um fator importante na qualidade e conservação dos vegetais submetidos ao processamento mínimo. A presença de microrganismos pode ser decorrente do manuseio inadequado e, estes podem prejudicar a qualidade sensorial bem como a segurança desses produtos (PEREIRA; MIYA; MAISTRO, 2001).

A ocorrência de microrganismos psicrotróficos e mesofílicos patogênicos é preocupante, visto que, estes podem se desenvolver durante todo o armazenamento e em variadas temperaturas (PINELI; ARAÚJO, 2006).

As diversas etapas do processamento podem se tornar fontes de contaminação microbiana. Embalagens com atmosfera modificada em condições inadequadas podem gerar

ambientes propícios ao desenvolvimento de patógenos anaeróbios, como o *Clostridium botulinum*, o qual pode se desenvolver em vegetais como brócolis, alface e repolho (OLIVEIRA; VALLE, 2000; CHITARRA; CHITARRA, 2005; JAY, 2005).

A contaminação por microrganismos patogênicos pode ocorrer direta ou indiretamente por fezes, animais ou insetos, solo, água de irrigação e lavagem contaminadas, equipamentos mal higienizados e sanitizados e manipuladores com higiene pessoal deficiente (OKURA; MARIANO; TEIXEIRA, 2006; SANT'ANA et al., 2002).

Em estudo realizado por Bonnas et al. (2005) foram avaliadas amostras de diferentes vegetais minimamente processados quanto à qualidade microbiológica. Verificou-se que todas as amostras apresentaram contaminação elevada por bactérias do grupo coliforme, evidenciando condições higiênico-sanitárias inadequadas.

Toxinfecções têm sido associadas ao consumo de hortaliças minimamente processadas. Nos EUA, casos de gastroenterites provenientes de hortaliças cruas vêm acontecendo nos últimos anos. Os principais patógenos causadores destas doenças foram *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* spp., encontrados em alfaces e brotos; *Shigella* em salsa e alface e *Cyclospora* em amoras (SILVA et al., 2003; PINELI; ARAÚJO, 2006; SILVA et al., 2007a).

A verificação das condições higiênico-sanitárias desses produtos prontos para o consumo é realizada por meio da determinação da presença de coliformes termotolerantes (à 45°C), que são bactérias bioindicadoras de qualidade higiênico-sanitária, e de *Salmonella* spp., um enteropatógeno envolvido em diversos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em muitos países (BRASIL, 2001).

A contaminação por estes microrganismos pode ser evitada empregando matéria-prima de boa qualidade, adotando medidas preventivas durante todo o processamento em vista da inexistência de tratamentos térmicos fortes, aplicando higienização adequada tanto para

equipamentos e utensílios quanto para manipuladores e condições adequadas de conservação (DAMASCENO; STAMFORD; ALVES, 2001; RIEDEL, 2005).

### **3.4. Bioindicadores de contaminação em vegetais minimamente processados**

#### **3.4.1. Bolores e leveduras**

Bolores e leveduras são microrganismos provenientes do solo e/ou do ar, resistentes a condições adversas, como pH ácido e baixa atividade de água, e a sua temperatura ótima se encontra na faixa de 25 a 28°C, fazendo com que estes microrganismos não se desenvolvam em temperaturas de refrigeração (FERREIRA et al., 2003; SILVA et al., 2007b).

Os fungos filamentosos e as leveduras compõem a população microbiana de diversos tipos de vegetais, como repolho, alface, espinafre, cebola e couve-flor, sendo as leveduras mais predominantes. O pH baixo desses alimentos permite o desenvolvimento de tais microrganismos (SANTOS; MURATORI; LOPES, 2005; VIEITES et al., 2005).

Como os fungos possuem o solo como habitat natural, isso faz com que contaminem facilmente frutas e hortaliças. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* spp. e *Rhizopus stolonifer* são alguns exemplos destes agentes fúngicos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os bolores e leveduras são indicadores de eficiência do processo de sanitização de equipamentos e utensílios durante o processamento de alimentos, pois esses microrganismos são considerados agentes potenciais de deterioração, com poder de oxidação de diferentes substratos, como os carboidratos (BRITO; ROSSI, 2005).

Além de reduzir a vida útil do produto, um grande número de fungos produz substâncias tóxicas denominadas micotoxinas, as quais oferecem perigo para a saúde do consumidor, causando danos no sistema nervoso e circulatório. As micotoxinas podem também apresentar

características carcinogênicas, sendo as aflatoxinas as mais potentes (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; JAY, 2005).

### **3.4.2. Bactérias do grupo coliforme**

O grupo coliforme é composto por microrganismos originários do trato gastrointestinal de humanos e animais, e também, por algumas bactérias não entéricas, como espécies de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Os coliformes totais são bastonetes Gram negativos, não esporulados, que fermentam a lactose dentro de 48 horas produzindo ácido e gás a 35°C, e comumente são utilizados como bioindicadores de contaminação em alimentos (JAY, 2005).

A presença de coliformes totais não indica necessariamente a presença de contaminação de origem fecal, mas que existem falhas durante o processamento do produto, salientando práticas higiênico-sanitárias deficientes (FURLANETO; SANTINI; VELASCO, 2005).

De acordo com Jay (2005) e Silva et al. (2007b) os coliformes termotolerantes também são bastonetes Gram negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose, porém em temperaturas maiores, 44 - 46°C em um período de 24 horas. Esse grupo de microrganismos também é conhecido como coliformes fecais, por compreender apenas as bactérias originárias do trato gastrointestinal.

Deste grupo de microrganismos, a bactéria *Escherichia coli* é a representante de maior relevância em alimentos, sendo que hoje ocupa o segundo lugar entre os agentes causadores de toxinfecções alimentares nos EUA, onde é responsável por 7,4 % dos surtos e por 28,6 % das mortes provocadas por bactérias no período de 1993 a 1997 (SILVA et al., 2003).

Conforme Sydow et al. (2006) o principal sintoma dessa enfermidade é a diarreia, e crianças e idosos são os alvos mais vulneráveis da doença. Os veículos de infecção têm sido produtos de origem animal, água e alimentos mal lavados como frutas, verduras e raízes.

Desta forma, a presença de coliformes totais e principalmente de *Escherichia coli*, revela condições higiênicas insatisfatórias, com provável contaminação pós-processamento, deficiência nos processos de limpeza e sanificação, e multiplicação durante o processamento ou estocagem (FORSYTHE, 2002).

### **3.4.3. *Salmonella* spp.**

O gênero *Salmonella* spp. é composto por microrganismos bastonetes Gram negativos, não esporulados, mesófilos, anaeróbios facultativos e desenvolvem-se bem a 37°C. Embora este microrganismo possua o trato intestinal de animais, como aves, répteis e animais de granja, como seu habitat natural, ele pode ser encontrado em outras partes do corpo (JAY, 2005).

Todos os sorotipos de *Salmonella* são considerados patogênicos, causando intoxicação ou infecção alimentar. O sorotipo mais virulento, *S. typhi*, causa a infecção febre tifóide, uma doença grave relacionada principalmente à ingestão de alimentos contaminados (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

De acordo com Guimarães et al. (2001) as bactérias deste gênero são os principais agentes responsáveis por surtos de origem alimentar em diferentes partes do mundo, sendo que estes vêm aumentando mesmo com o crescente desenvolvimento de tecnologias de conservação.

Os principais sintomas causados por estas toxinfecções alimentares são febre, náuseas, dor abdominal, cólica e diarreia, e se manifestam aproximadamente 12 horas após a ingestão

do alimento contaminado (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Jay (2005) explica que a infecção alimentar causada por *Salmonella* ocorre por meio da ingestão de alimentos que contenham uma contagem significativa, e que a média da taxa de mortalidade é de 4,1%. Deste percentual, 5,8% correspondem aos casos que ocorrem durante o primeiro ano de vida, 2% entre o primeiro e os 50 anos e de 15% em pessoas acima de 50 anos. A *S. choleraesuis* é o sorotipo que apresenta maior número de casos com mortalidade.

Estudos vêm sendo realizados com a finalidade de reduzir o risco de contaminação por este patógeno. Uma das alternativas muito discutidas é a implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o qual abrange todo o processamento, desde a matéria-prima até o produto final (GUIMARÃES et al., 2001).

### **3.5. Boas práticas de fabricação**

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) compreendem uma série de normas empregadas na indústria alimentícia, relacionadas às edificações, equipamentos, processamentos, produtos finais e documentação. Essas normas possuem como objetivo a garantia de alimentos seguros e de boa qualidade nutritiva (TOMICH et al., 2005).

A adoção das BPF é uma importante ferramenta na prevenção da produção de alimentos inseguros, ou seja, aqueles que possuem algum contaminante capaz de provocar danos à saúde do consumidor (PIRAGINE, 2005).

Em países desenvolvidos, as toxinfecções alimentares recebem grande atenção, sendo divulgadas como problema de saúde pública. Já em países em desenvolvimento o problema é mais grave devido à fome, desnutrição, falta de saneamento básico e de cobertura dos serviços da Vigilância Sanitária de Alimentos. Tais fatores contribuem para uma maior incidência de surtos alimentares e uma alta taxa de mortalidade infantil (AMSON, 2005).



Conforme o mesmo autor, a implantação de sistemas de segurança alimentar deve atribuir cuidados a todas as etapas, desde a recepção da matéria-prima até o consumo do produto final.

Segundo Tomich et al. (2005) a avaliação das BPF em estabelecimentos de produção ou comercialização de alimentos é feita por meio de um questionário, o qual é aplicado com o objetivo de verificar o cumprimento de tais normas, afim de eliminar ou reduzir riscos de contaminação.

Esta ferramenta denominada *check list* verifica as condições higiênico-sanitárias de tais estabelecimentos, visando atribuir adequações por meio da identificação de pontos críticos nas edificações, equipamentos/utensílios, bem como na higiene comportamental e pessoal dos manipuladores envolvidos na linha de processamento (SENAC, 2001).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção das amostras**

Para o desenvolvimento desse trabalho, amostras de vegetais minimamente processados, foram cedidas por uma microempresa localizada no município de São José do Rio Preto - SP, e estas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

As coletas foram realizadas entre novembro/08 e outubro/09, período em que foram efetuadas seis repetições. Em cada uma foram coletadas duas amostras de sete diferentes tipos de vegetais, totalizando 84 amostras. As análises microbiológicas foram efetuadas logo após o processamento ( $t_0$ ) e com 7 dias de vida de prateleira ( $t_7$ ), correspondente ao último dia de vida útil do produto.

Nas três primeiras coletas, realizadas entre os meses de novembro/08 e abril/09, foram coletadas amostras embaladas de 100 g de acelga, cenoura, couve, milho, quiabo, repolho e vagem. A partir disto, a microempresa parou de produzir quiabo e repolho; desde então foram coletadas amostras de abóbora e couve-flor. A quarta, quinta e sexta coletas foram realizadas entre setembro/09 e outubro/09. Neste mesmo período seis amostras de água foram coletadas para análise microbiológica.

### **4.2. Preparo das amostras**

Neste estudo foram investigados como bioindicadores de contaminação em vegetais, bactérias do grupo coliforme, *Salmonella* spp. e enumeração de bolores e leveduras. Nas amostras de água avaliou-se a população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias do grupo

coliforme. Todas as análises foram efetuadas conforme metodologia recomendada por Silva et al. (2007b).

No Laboratório as amostras foram identificadas e posteriormente pesados assepticamente 10g / 10 mL de cada uma em um frasco de Erlenmeyer contendo 90 mL de água destilada estéril, os quais foram homogeneizados constituindo a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram efetuadas as demais diluições decimais seriadas utilizando o mesmo diluente.

#### **4.3. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas**

Foram pipetados assepticamente 1,0 mL das diluições previamente preparadas e colocados em placas de Petri devidamente identificadas. Adicionou-se a seguir 15,0 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) e, após a homogeneização, as placas foram incubadas à 35°C por 24 - 48 horas, e após este período foram calculadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

#### **4.4. Enumeração de bolores e leveduras**

Foi pipetado assepticamente 1,0 mL de cada diluição e distribuído em placas de Petri esterilizadas e identificadas. Foram adicionados a cada placa 15,0 mL de Batata Dextrose Ágar (PDA) acidificado com ácido tartárico à 10% (pH = 4,0), ambos esterilizados. Após solidificação as placas foram incubadas em estufa à 25°C por 5 dias. As UFC foram calculadas multiplicando a contagem pelo inverso da diluição.

#### **4.5. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais**

A técnica dos tubos múltiplos foi utilizada, empregando-se o Caldo Lauril Sulfato (CLS) com incubação a 35°C durante 48 horas.

#### **4.6. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes**

Foi empregado o método dos tubos múltiplos, utilizando-se o Caldo *Escherichia coli* (EC) com incubação a 44,5°C durante 24 horas. A determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes foi realizada empregando-se a tabela de *Hoskins*.

#### **4.7. Pesquisa de *Escherichia coli***

A partir dos tubos de ensaio contendo caldo EC utilizados na quantificação de coliformes termotolerantes que apresentaram gás no interior do tubo de Durham, foi retirada uma alíquota de inóculo, o qual foi semeada por esgotamento em placas de Petri contendo Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L - EMB). As colônias suspeitas foram identificadas utilizando-se os testes bioquímicos de IMVIC, ou seja, de indol/vermelho de metila/Voges-Proskauer/citrato.

#### **4.8. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Em 225 mL de Caldo Lactosado (CL) foram homogeneizados 25g de cada amostra. Depois da incubação a 35°C por 24 horas, 1 mL de cada cultivo foi transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL de Caldo Selenito Cistina (CSC). Após 24, 48 e 120 horas foram

realizadas semeaduras em placas de Petri contendo *Salmonella Shigella* Ágar (SSA), as quais foram incubadas a 35°C por 24 horas. As UFC com coloração creme com ou sem centro negro, foram submetidas ao teste sorológico.

#### **4.9. Isolamento das culturas de leveduras**

A partir da enumeração de bolores e leveduras, foram isoladas após cinco dias de incubação a 25°C, culturas de todos os tipos morfológicos presentes. Em seguida, cada cultura pura, previamente submetida à coloração de Gram e observada sob microscopia (microscópio óptico comum), recebeu um código de identificação, ou seja, VMPC<sub>t,n1</sub> onde VMP = vegetal minimamente processado, C = número da coleta, <sub>t</sub> = tempo (0 ou 7) e n1 = número da levedura isolada desta amostra. Foram estocadas em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo meio “Gymp” (2,0 % de glicose, 0,5 % de extrato de levedura, 1,0 % de extrato de malte, 0,2 % de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2,0 % de ágar), para posterior identificação, sendo então cobertas com óleo mineral para evitar ressecamento e mantidas a 8 ± 2°C.

#### **4.10. Provas taxonômicas**

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos) foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij (1984) e Barnett; Payne; Yarrow (1983 e 1990).

A identificação das culturas foi realizada segundo chaves descritas por Barnett; Payne; Yarrow (1990) e Kurtzman e Fell (1998).

#### **4.11. Provas morfológicas**

Para verificação da produção de esporos foram utilizados o meio de cultura de Gorodkowa (glicose 0,1 %, peptona 1,0 %, NaCl 0,5 % e ágar 1,8 %) e o ágar acetato de McClary (glicose 0,1 %, KCl 0,18 %, extrato de levedura 0,25 %, acetato de sódio 0,82 % e ágar 1,8 %). As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente e as observações feitas periodicamente entre 7, 14 e 21 dias (KURTZMAN; FELL, 1998).

#### **4.12. Provas fisiológicas**

##### **4.12.1. Capacidade fermentativa**

Para verificar a capacidade fermentativa das culturas foi utilizado o meio básico para fermentação (peptona 0,75 % e extrato de levedura 0,5 %). O mesmo foi colocado em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo tubo de Durham invertido. Os açúcares, glicose 1,0 %, sacarose 2,0 %, maltose 1,0 % e lactose 1,0 %, foram esterilizados separadamente do meio de cultura e, posteriormente adicionados.

Inicialmente foi testada a capacidade fermentativa frente à glicose. As culturas que apresentaram resultado positivo foram então submetidas a três dissacarídeos: sacarose, maltose e lactose.

Os tubos de ensaio foram mantidos à temperatura ambiente, sendo as leituras realizadas entre 7, 14 e 21 dias. Considerou-se resultado positivo quando 1/3 a 3/3 do tubo de Durham estivesse preenchido com gás e negativo quando não houvesse tal produção (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### **4.12.2. Desenvolvimento em diversas temperaturas**

Foi analisada a capacidade de desenvolvimento à 35, 40 e 42°C, utilizando-se o meio básico para fermentação (peptona 0,75 % e extrato de levedura 0,5 %) acrescido de 2,0 % de glicose. Para a temperatura de 35°C, os tubos de ensaio foram mantidos em estufa de incubação e para as demais foi utilizado o banho-maria. As leituras foram feitas por meio do Cartão de Whickerham (KREEGER VAN RIJ, 1984) após 48 - 72 horas de incubação. Foi considerado desenvolvimento positivo quando as linhas do cartão não foram visíveis e negativo quando foram visualizadas.

#### **4.12.3. Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato**

Foi utilizado o *Yeast Carbon Base* 1,17 % (YCB) contendo 0,078 % de KNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio e 1,8 % de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### **4.12.4. Resistência à pressão osmótica**

Neste teste foram utilizadas duas substâncias distintas. O meio básico para ambas foi o Ágar Sabouraud Glicose (ASG). Para um dos testes, foi acrescentado 50,0 % de glicose e para o outro 10,0 % de NaCl (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### **4.12.5. Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione)**

Para esta prova foi empregado o *Yeast Nitrogen Base* 0,67 % (YNB) acrescido de 1,0 % de glicose, 1,8 % de ágar e alíquotas de cicloheximida que variou de acordo com a concentração desejada (100 ou 1000 partes por milhão - ppm), segundo metodologia descrita por Kreeger Van Rij (1984).

#### **4.12.6. Síntese de amido**

Para a verificação da produção de compostos amilóides foi utilizado o ASG (glicose 2,0 %, peptona 1,0 %, extrato de levedura 0,5 % e ágar 1,8 %). Após o desenvolvimento das culturas, foi gotejada sobre as mesmas uma solução de lugol. O aparecimento da coloração azul escura indicou resultado positivo (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### **4.12.7. Provas de assimilação de fontes de carbono**

Foram usadas as seguintes substâncias: glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-manitol, D-glucitol (sorbitol), salicina, citrato, M-inositol e glicosamina. Todas as substâncias foram utilizadas na concentração de 0,5 %, exceto a rafinose que foi a 1,0 %, acrescidas ao YNB 0,67 % mais 1,8 % de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).



#### 4.13. Ensaio de resistência aos sanitizantes hipoclorito de sódio e ozônio

Para esta prova foi utilizado o ASG (glicose 2,0%, peptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e ágar 1,8%) onde foi acrescido o sanitizante hipoclorito de sódio nas concentrações 50, 100, 200 e 400 ppm e o ozônio nas concentrações 0,25 e 0,50 ppm. Para verificar o desenvolvimento microbiano foi empregado como controle o mesmo meio de cultura, porém sem a adição do sanitizante. Foram esterilizados separadamente por autoclavagem, o meio básico (sem ágar), o ágar e os sanitizantes, para evitar, em primeiro lugar, a hidrólise do ágar durante o aquecimento, com a perda do poder de gelificação e, no que se refere aos sanitizantes utilizados, eventual perda por hidrólise ou evaporação.

#### 4.14. Técnica de *Replica-plate*

A técnica de *Replica-plate* foi usada para as provas descritas nos itens 4.11., 4.12.3. a 4.12.7., 4.13.

Nos testes em que foi utilizado este método, como inóculo, culturas de 24 - 48 horas em meio “Gymp” foram transferidas e pré-incubadas durante 3 a 5 dias à temperatura ambiente em YNB 0,67 % líquido contendo 0,1 % de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno. A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema *replica-plate multitipado*, que permite a inoculação de 25 colônias/placa de Petri (LEDERBERG; LEDERBERG, 1952; SHEREE LIN; FUNG; COX, 1987).

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 25°C, com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação.

#### 4.15. Aplicação do formulário *check-list*

Para avaliar as adequações quanto às BPF foi utilizado o formulário *check-list* (Anexo A) onde cada item avaliado foi classificado como em conformidade ou não, segundo os critérios estabelecidos na Tabela 1.

A cada item avaliado foi designada uma nota, conforme representado na Tabela 1 (BRASIL, 2002).

Com relação à classificação da linha de processamento sob o ponto de vista higiênico-sanitário, o *check-list* foi dividido em bloco 1: edificações/instalações, bloco 2: equipamentos/utensílios, bloco 3: manipuladores, bloco 4: manufatura do alimento e bloco 5: documentação.

**Tabela 1.** Notas e critérios direcionados ao diagnóstico da linha de processamento.

Nota	Crítérios avaliados
0	Quando o item em avaliação não estiver em conformidade.
1	Quando o item em avaliação estiver em conformidade e sua importância relativa ao preparo do alimento for baixa.
2	Quando o item em avaliação estiver em conformidade e sua importância relativa ao preparo do alimento for média.
4	Quando o item em avaliação estiver em conformidade e sua importância relativa ao preparo do alimento for média-alta.
6	Quando o item em avaliação estiver em conformidade e sua importância relativa ao preparo do alimento for alta.

**Fonte:** BRASIL (2002).

Na Figura 2 é possível observar a equação empregada para a verificação das condições higiênico-sanitárias obtidas por meio do formulário *check-list* para cada bloco (BRASIL, 2002).

O cálculo das notas foi obtido utilizando-se uma constante (K) específica para cada bloco. Este método é utilizado para não penalizar a planta de processamento da empresa, caso alguns critérios forem considerados “N.A.” (não aplicáveis). Os valores das constantes estão demonstrados na Tabela 2. O cálculo final de cada bloco é encontrado utilizando um peso específico. Estes são utilizados conforme a importância de cada bloco para a avaliação higiênico-sanitária, conforme Tabela 3.

$$PB_n = \frac{TS_n \cdot P_n}{(K_n - TNA_n)}$$

$PB_n$  = pontuação da microempresa para o bloco n.  
 $TS_n$  = somatório das respostas “sim” obtidas.  
 $K_n$  = constante do bloco numericamente igual ao valor máximo atribuível.  
 $TNA_n$  = somatório das respostas “não aplicável” obtidas.  
 $P_n$  = peso atribuído a cada bloco.  
 $n$  = índice referente a cada bloco.

**Figura 2.** Fórmula para o cálculo da pontuação de cada bloco.

**Tabela 2.** Constante K característica para cada bloco avaliado.

Blocos	Valores de K (n = 1, 2, 3 e 4)
1 - Edificação e Instalações	60
2 - Equipamentos e utensílios	50
3 - Manipuladores	32
4 - Processamento de alimento	24

**Fonte:** BRASIL (2002).

A nota final foi calculada pela somatória dos valores encontrados em cada um dos quatro blocos, conforme equação:  $NT = PB1+PB2+PB3+PB4+PB5$ . Ao final de cada inspeção a microempresa foi classificada conforme demonstra a Tabela 4.

A microempresa foi classificada conforme a pontuação final pela somatória de cada bloco que totaliza no máximo 175 pontos. Deve atingir pontuação mínima de 75 pontos de conformidade. Quando o estabelecimento se encontra abaixo da pontuação mínima este é considerado como fora dos padrões estabelecidos e deverá promover melhorias, adotando-se as boas práticas higiênico-sanitárias exigidas.

**Tabela 3.** Pesos específicos para a aplicação na equação da Figura 2.

Blocos	Peso específico P (n = 1, 2, 3 e 4)
1 - Edificação e instalações	10
2 - Equipamentos e utensílios	15
3 - Manipuladores	25
4 - Produção de alimentos	20
5 - Documentação	30

**Fonte:** BRASIL (2002).

**Tabela 4.** Classificação higiênico-sanitária para a microempresa.

Classificação	Pontuação
Precário	0-30
Deficiente	31-60
Regular	61-90
Bom	91-120
Muito bom	121-150
Excelente	151-175

**Fonte:** BRASIL (2002).

#### **4.16. Delineamento experimental**

Foi feita a Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as médias pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância  $p < 0,05$ , utilizando o programa computacional Minitab.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas para bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* realizadas nas amostras de água estão expressos na Tabela 5. Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os resultados das análises realizadas nos diferentes vegetais (abóbora, acelga, cenoura, couve, couve-flor, milho, quiabo, repolho e vagem), logo após o processamento ( $t_0$ ) e com sete dias de vida de prateleira ( $t_7$ ).

#### 5.1.1. Água

Os resultados das análises realizadas nas amostras de água indicaram que nenhuma delas apresentou contagens acima do padrão preconizado pela legislação para bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* (BRASIL, 2004).

Conforme apresentado na Tabela 5, as amostras apresentaram valores médios de  $1,00 \times 10^0$  UFC/mL para bactérias aeróbias mesófilas,  $< 2$  NMP/mL para coliformes totais e termotolerantes e não foi constatada a presença de *Escherichia coli* em nenhuma delas. Desta forma, tais valores foram satisfatórios, visto que a presença destes microrganismos podem comprometer a saúde do consumidor.

Estes resultados obtidos são inferiores aos obtidos por d'Aguila et al. (2000), os quais verificaram o nível de contaminação por coliformes totais e termotolerantes em 61,5 % das amostras de água utilizada para abastecimento público do município de Nova Iguaçu. Em amostras de água de poços artesianos que também abastecem a cidade, o nível de contaminação foi de 97,7 %.

**Tabela 5.** Resultados das análises microbiológicas efetuadas nas amostras de água.

	Água	Padrão
Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/mL) N <sup>a</sup>	1,00 x 10 <sup>0</sup>	5,00 x 10 <sup>2</sup>
Coliformes totais (NMP/mL) N <sup>a</sup>	< 2	aus. / 100mL
Coliformes termotolerantes (NMP/mL) N <sup>a</sup>	< 2	aus. / 100mL
<i>Escherichia coli</i> ( % )	-	aus. / 100mL

N<sup>a</sup>: valores médios de 6 repetições.

Em contrapartida Freitas; Brilhante; Almeida (2001) ao analisarem as condições higiênico-sanitárias de água para consumo das regiões Parque Fluminense e Colubandê na região metropolitana do Rio de Janeiro, encontraram, respectivamente, percentuais de 6,2 % e 6,6 % de amostras fora do padrão estabelecido.

Resultados similares foram obtidos por Alves; Odorizzi; Goulart (2002) que ao avaliarem a qualidade microbiológica da água consumida em residências na cidade de Marília - SP, verificaram que apenas 5,5 % das amostras apresentaram contaminação por coliformes totais.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, observa-se que a água utilizada na microempresa encontra-se perfeitamente adequada para a utilização no processamento dos vegetais.

### 5.1.2. Vegetais minimamente processados

Na legislação brasileira há recomendação apenas para contagem de coliformes termotolerantes ( $10^2$  UFC/g) e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g da amostra (BRASIL, 2001). Das 84 amostras analisadas, nenhuma apresentou resultados acima do recomendado, revelando alimentos relativamente seguros para a saúde humana. É válido destacar que após sugestões dadas à microempresa, foram observadas reduções nos resultados para coliformes totais e termotolerantes nas amostras da quinta e sexta coleta.

Mesmo que para bolores e leveduras não exista padrão para vegetais minimamente processados estabelecido pela legislação, a maioria das amostras apresentou valores elevados para tais microrganismos.

Conforme as Tabela 6 e 7, nas análises realizadas no tempo zero e sete, os valores médios obtidos para bolores e leveduras em todas as amostras, variaram de  $5,90 \times 10^2$  a  $8,01 \times 10^5$  UFC/g, e de  $5,50 \times 10^3$  a  $4,84 \times 10^6$  UFC/g respectivamente. Com exceção das amostras de acelga e cenoura, as demais amostras não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) do tempo zero para o tempo sete.

Estes resultados são preocupantes, pois tais microrganismos são responsáveis pela redução da vida útil do produto, levando à perdas econômicas significativas para a indústria, e pela produção de micotoxinas, gerando riscos à saúde do consumidor.

Rosa et al. (2004), analisando 140 amostras de diversas hortaliças minimamente processadas, verificaram que 70,6 % das amostras apresentaram contagens para bolores e leveduras acima de  $10^2$  UFC/g.



**Tabela 6.** Resultados das análises microbiológicas nas amostras de acelga, cenoura, couve, milho e vagem após o processamento ( $t_0$ ) e com sete dias após a data de fabricação ( $t_7$ ).

	Acelga		Cenoura		Couve		Milho		Vagem		Padrão*
	N <sup>a</sup> $t_0$	N <sup>a</sup> $t_7$	N <sup>a</sup> $t_0$	N <sup>a</sup> $t_7$	N <sup>a</sup> $t_0$	N <sup>a</sup> $t_7$	N <sup>a</sup> $t_0$	N <sup>a</sup> $t_7$	N <sup>a</sup> $t_0$	N <sup>a</sup> $t_7$	
Coliformes totais (NMP/g)	2,36 x 10 <sup>2a</sup>	5,15 x 10 <sup>2a</sup>	9,42 x 10 <sup>2b</sup>	7,29 x 10 <sup>2b</sup>	5,80 x 10 <sup>2c</sup>	5,65 x 10 <sup>2c</sup>	7,50 x 10 <sup>2d</sup>	7,84 x 10 <sup>2d</sup>	1,00 x 10 <sup>2e</sup>	3,98 x 10 <sup>2e</sup>	-
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	2,50 x 10 <sup>0a</sup>	8,83 x 10 <sup>0a</sup>	2,00 x 10 <sup>0b</sup>	9,17 x 10 <sup>0b</sup>	2,00 x 10 <sup>0c</sup>	2,33 x 10 <sup>0c</sup>	5,17 x 10 <sup>0d</sup>	5,50 x 10 <sup>0d</sup>	3,17 x 10 <sup>0e</sup>	8,83 x 10 <sup>0e</sup>	10 <sup>2</sup>
Bolores e leveduras (UFC/g)	7,98 x 10 <sup>4a</sup>	2,02 x 10 <sup>6b</sup>	1,57 x 10 <sup>5c</sup>	2,12 x 10 <sup>6d</sup>	2,05 x 10 <sup>4e</sup>	2,80 x 10 <sup>6e</sup>	8,01 x 10 <sup>5f</sup>	4,84 x 10 <sup>6f</sup>	8,84 x 10 <sup>4g</sup>	1,92 x 10 <sup>6g</sup>	-
<i>Escherichia coli</i> (%)	16,7	16,7	-	33,3	-	16,7	33,3	16,7	16,7	33,3	-
<i>Salmonella</i> spp.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus./25g

N<sup>a</sup>: valores médios de 6 repetições no tempo zero ( $t_0$ ) e no tempo 7 ( $t_7$ ). Letras iguais na mesma linha para cada tipo de vegetal avaliado, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- : ausência de padrão microbiológico na legislação.

\*Brasil (2001).

**Tabela 7.** Resultados das análises microbiológicas nas amostras de quiabo, repolho, abóbora e couve-flor após o processamento ( $t_0$ ) e com sete dias após a data de fabricação ( $t_7$ ).

	Quiabo		Repolho		Abóbora		Couve-flor		Padrão*
	$N^a t_0$	$N^a t_7$	$N^a t_0$	$N^a t_7$	$N^a t_0$	$N^a t_7$	$N^a t_0$	$N^a t_7$	
Coliformes totais (NMP/g)	$4,50 \times 10^{2a}$	$3,82 \times 10^{2a}$	$2,97 \times 10^{1b}$	$3,82 \times 10^{2b}$	$3,81 \times 10^{2c}$	$3,77 \times 10^{2c}$	$5,73 \times 10^{1d}$	$1,57 \times 10^{3d}$	-
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	$2,00 \times 10^{0a}$	$2,00 \times 10^{0a}$	$2,00 \times 10^{0b}$	$2,00 \times 10^{0b}$	$2,00 \times 10^{0c}$	$2,00 \times 10^{0c}$	$2,00 \times 10^{0d}$	$2,00 \times 10^{0d}$	$10^2$
Bolores e leveduras (UFC/g)	$5,90 \times 10^{2a}$	$5,50 \times 10^{3a}$	$1,29 \times 10^{5b}$	$1,90 \times 10^{4b}$	$1,28 \times 10^{4c}$	$1,00 \times 10^{6c}$	$3,26 \times 10^{3d}$	$1,61 \times 10^{5d}$	-
<i>Escherichia coli</i> (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus./25g

$N^a$ : valores médios de 3 repetições no tempo zero ( $t_0$ ) e no tempo 7 ( $t_7$ ). Letras iguais na mesma linha para cada tipo de vegetal avaliado, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- : ausência de padrão microbiológico na legislação.

\*Brasil (2001).

Santos; Muratori; Lopes, (2005) avaliando 30 amostras de cenoura, constataram contagens de bolores e leveduras em 100% das amostras, sendo que 73,3% dessas apresentaram contagens acima de  $10^6$  UFC/g, níveis considerados de risco para a produção de micotoxina. Em contrapartida, resultados verificados por Oliveira; Pantaroto; Cereda, (2003) mostraram contagens mínimas de bolores e leveduras em mandioca minimamente processada, mesmo depois de 4 semanas após o processamento.

De acordo com as Tabelas 6 e 7 verificou-se para coliformes totais valores médios variando de  $2,97 \times 10^1$  a  $9,42 \times 10^2$  para o tempo zero, e de  $3,77 \times 10^2$  a  $1,57 \times 10^3$  para o tempo sete. Os resultados não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Embora a legislação brasileira também não preconize limite máximo para coliformes totais nesse alimento, 38 % das amostras apresentaram resultados muito elevados (1100 e > 1100), o que indica que possam haver falhas na recepção dos vegetais, no processamento ou na conservação do produto final, que podem proporcionar uma contaminação ou condições propícias para o desenvolvimento de microrganismos já presentes.

Vitti et al. (2004b) afirmam que embora não haja na legislação brasileira vigente padrões para coliformes totais, tem sido preconizado que alimentos contendo contagens microbianas muito altas podem ser considerados impróprios para o consumo humano, devido à perda do valor nutricional, alterações organolépticas e ainda riscos de contaminação por microbiota patogênica.

Rinaldi; Benedetti; Moretti, (2008) analisando a qualidade microbiológica de repolho minimamente processado, verificaram altas contagens de coliformes totais para todas as amostras investigadas, sendo que o produto apresentou 5 ciclos logarítmicos de coliformes totais no 9º. dia de vida de prateleira.

Pilon e colaboradores (2006) avaliando a vida útil de pimentão submetido ao processamento mínimo, constataram contagens de coliformes totais variando de  $< 10$  a  $7,4 \times$

10<sup>5</sup> UFC/g após 21 dias de armazenamento sob refrigeração.

Por outro lado, Furtunato; Magalhães; Maria, (2000) e Beerli; Boas; Piccoli, (2004) não observaram contagens elevadas destes microrganismos em feijão verde e cebola submetidos ao processamento mínimo, respectivamente.

Conforme Pinheiro et al. (2005) os produtos minimamente processados ficam muito vulneráveis a todo tipo de contaminação após a remoção da casca, pois esta funciona como barreira física contra a penetração de microrganismos, que então se torna facilitada. Portanto boas práticas de manipulação e o controle da temperatura são indispensáveis na minimização da contaminação e no controle do desenvolvimento microbiano.

Para coliformes termotolerantes todas as amostras apresentaram resultados mínimos (Tabelas 6 e 7), respeitando o limite preconizado (10<sup>2</sup> UFC/g) pela legislação (BRASIL, 2001). Nenhum resultado apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). É importante destacar que estes resultados são satisfatórios, pois tais microrganismos podem provocar doenças veiculadas por alimentos e revelam contaminação de origem fecal.

Lund e colaboradores (2005) não obtiveram resultados elevados para coliformes fecais em amostras de mandioca. Resultados similares foram obtidos por Srebernich (2007) ao analisar 56 amostras de cheiro-verde minimamente processado, em que todas as amostras não apresentaram resultados acima do permitido pela legislação para este microrganismos.

Vitti et al. (2004b) avaliaram beterraba minimamente processada e não detectaram presença de coliformes fecais em todas as amostras. Em contrapartida Furlaneto; Santini; Velasco, (2005) analisaram diversos tipos de hortaliças e constataram que 80 % destas apresentavam-se fora do padrão estabelecido para coliformes fecais.

Santos (2009) afirma que a manipulação de forma adequada durante todas as etapas do processamento do alimento, bem como a adoção das praticas de fabricação adequadas, dificultam a contaminação e o desenvolvimento de coliformes termotolerantes no alimento.

Oliveira et al. (2005) ressaltaram que a presença de coliformes termotolerantes é mais significativa como indicação de contaminação fecal, do que a presença de coliformes totais, o que indica condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante o processamento.

Nos resultados para coliformes totais e fecais, ocorre em alguns um decréscimo no número de microrganismos presentes do tempo zero para o tempo sete. Segundo Jay (2005) essa situação pode ser causada pela baixa temperatura de refrigeração, a qual inibe o crescimento desses microrganismos, ou mesmo por baixa competitividade com a microbiota presente.

Com relação à bactéria *Escherichia coli*, foi detectada a sua presença em acelga, cenoura, couve, milho e vagem, totalizando apenas 11 (13 %) das 84 amostras analisadas (Tabela 6). Resultados semelhantes foram observados por Cabrini et al. (2002) ao analisarem amostras de alface, verificando a presença deste microrganismo em apenas 7 % das amostras.

Por outro lado Furlaneto; Santini; Velasco, (2005) constataram presença desta bactéria em 80% das amostras de diferentes vegetais minimamente processados. Resultados similares foram obtidos por Bonnas et al. (2005), em que a presença de *Escherichia coli* foi observada em 100% das amostras de vegetais minimamente processados comercializados na cidade de Uberlândia.

Segundo Seixas (2008) a presença de microrganismos indicadores de contaminação de origem fecal evidencia falhas graves durante as etapas do processamento, indicando que o alimento se encontra exposto à fatores que levam a introdução e ao desenvolvimento de microbiota patogênica.

Pires e colaboradores (2006) analisando a estabilidade de vegetais minimamente processados, não verificaram a presença deste microrganismo patogênico em nenhuma das amostras, demonstrando, portanto que as BPF e a etapa de sanitização foram eficazes para garantir a segurança do produto para o consumo.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras de vegetais minimamente processados (Tabelas 6 e 7), portanto todas estão de acordo com a legislação, a qual estabelece ausência desse microrganismo em 25g de produto (BRASIL, 2001).

Aguila et al. (2006) analisando a microflora de rabanetes minimamente processados, não constatou a presença de *Samonella* spp. em nenhuma das amostras. Sasaki et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes, verificando ausência desse microrganismo em todas as amostras avaliadas de abóbora.

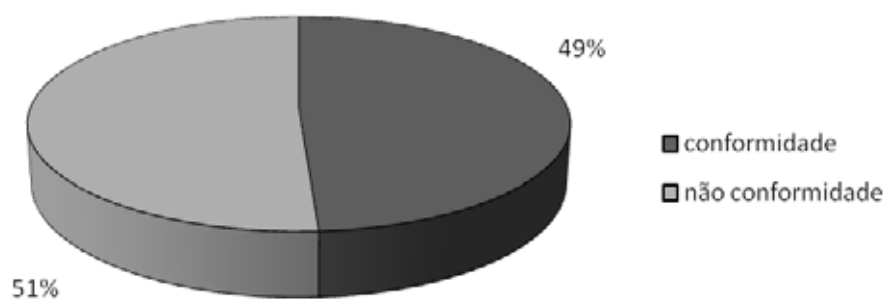
Em contrapartida, Oliveira et al. (2005) avaliando a qualidade higiênico-sanitária de alfaces, detectou a presença desse microrganismo em 14 (93,3 %) de um total de 15 amostras, indicando que tal produto se encontrava impróprio para o consumo humano.

Ferreira et al. (2003) afirmam que a presença de *Salmonella* spp. em vegetais pode ser explicada de várias maneiras. A contaminação pode ocorrer antes ou após a colheita, por meio do solo, ar, água de irrigação / lavagem contaminada, más condições de transporte e danos físicos.

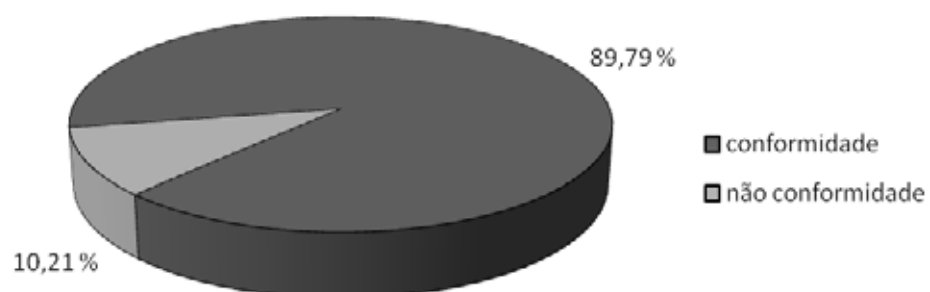
## **5.2. Formulário *check-list*: análise das BPF**

A avaliação inicial quanto às BPF foi realizada em outubro de 2008, onde a micro-empresa obteve 49 % de conformidade (85,71 pontos), classificando-a como regular, ou seja, em condições inadequadas para grande parte dos critérios analisados. Já a verificação final realizada em novembro de 2009, com o objetivo de observar as melhorias realizadas, classificou a microempresa como muito bom, a qual obteve 145,82 pontos e o percentual de 89,79 % de conformidade (Figura 3).

(i)



(f)



**Figura 3.** Resultado geral do *check-list* inicial (i) e *check-list* final (f) aplicados na microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP, quanto a critérios de conformidade.

Resultados inferiores foram observados por Akutsu et al. (2005) ao monitorarem cinquenta estabelecimentos produtores de alimentos da região de Brasília quanto à adoção das BPF, verificando percentuais de 30,0 - 69,0 % de adequação na avaliação final.

Os critérios de conformidade e não conformidade, para cada bloco avaliado podem ser observados na Figura 4. Nos *check-list* inicial e final, os blocos 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram, respectivamente, percentuais de conformidade de 36,60 %, 42,86 %, 21,43 %, 36,36 %, 4,17 % e 62,82 %, 47,62 %, 71,43 %, 57,58 %, 4,17 %.

Os blocos 1, 2, 3 e 4 apresentaram aumento nos percentuais de conformidade no *check-list* final, porém, o bloco 5, correspondente à documentação, apresentou pequeno índice de conformidade, tanto na avaliação inicial como na final, o que indica a necessidade de melhorias neste aspecto.

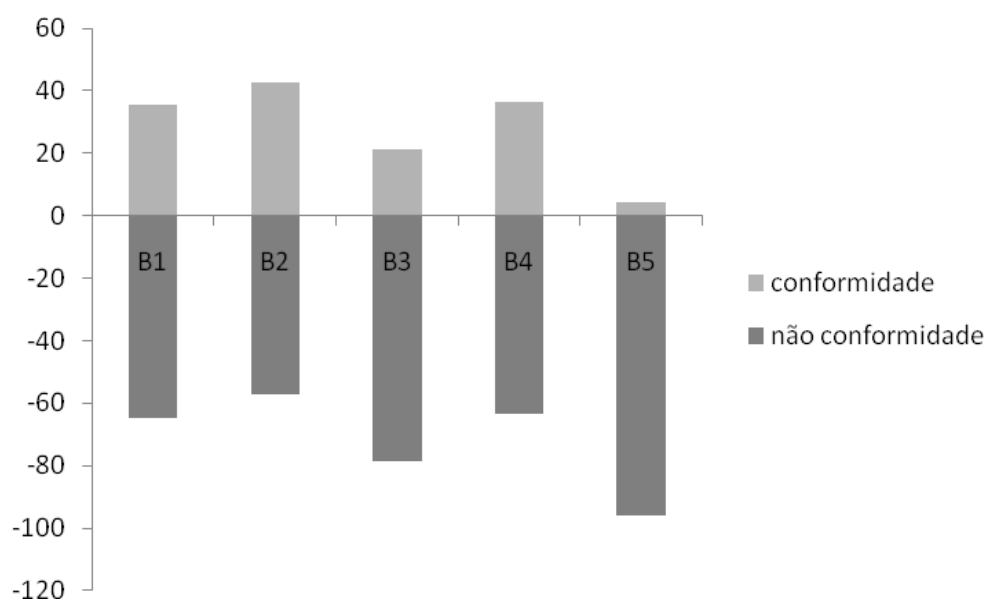
Para edificações e instalações (bloco 1) os sub-blocos tetos (e), paredes e divisórias (f), portas (g), instalações sanitárias e vestiários para os manipuladores (j), lavatórios na área de produção (l), higienização das instalações (o), controle integrado de vetores e pragas urbanas (p), abastecimento de água (q) e manejo de resíduos (r) apresentaram melhoria no índice de conformidade no *check-list* final comparado ao *check-list* inicial (Figura 5).

Os sub-blocos área interna (c), piso (d), janelas e demais aberturas (h), iluminação e instalação elétrica (m), ventilação e climatização (n) e “layout” (t) continuaram com o mesmo nível de conformidade no *check-list* final. Os demais sub-blocos apresentaram total inconformidade nas duas avaliações.

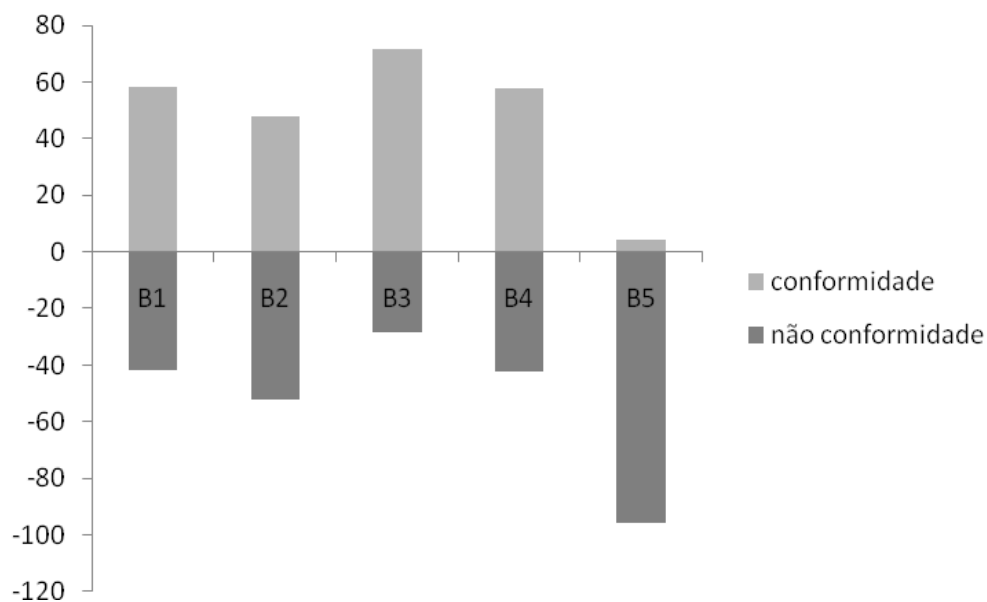
Tomich et al. (2005) ao avaliarem a aplicação das BPF em indústrias de massas congeladas de pão de queijo verificaram que entre todos os blocos analisados, aquele correspondente à construção e manutenção da edificação recebeu menor pontuação quanto à conformidade e, ressalta que este bloco é o que menos interfere na qualidade do produto final.



(i)

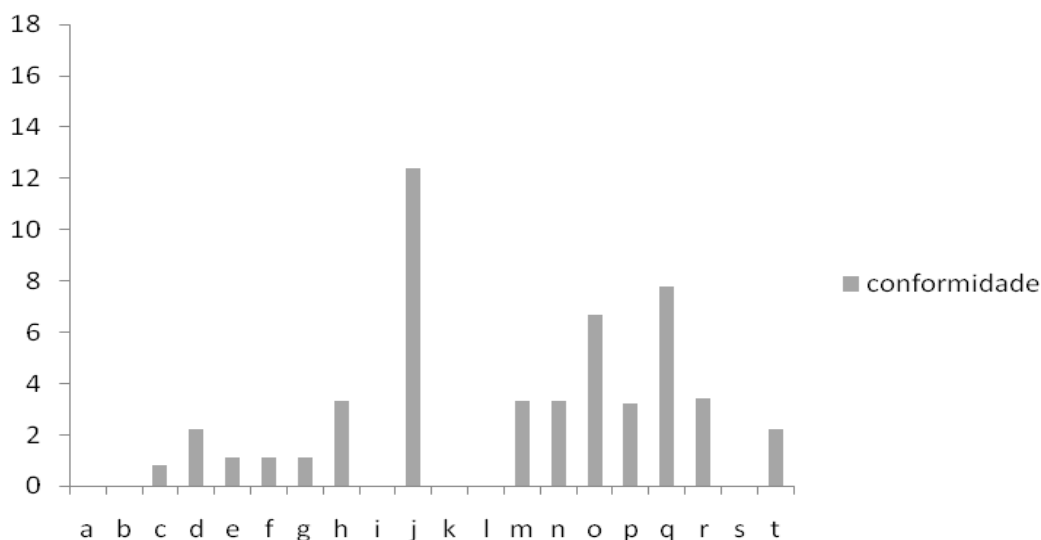


(f)

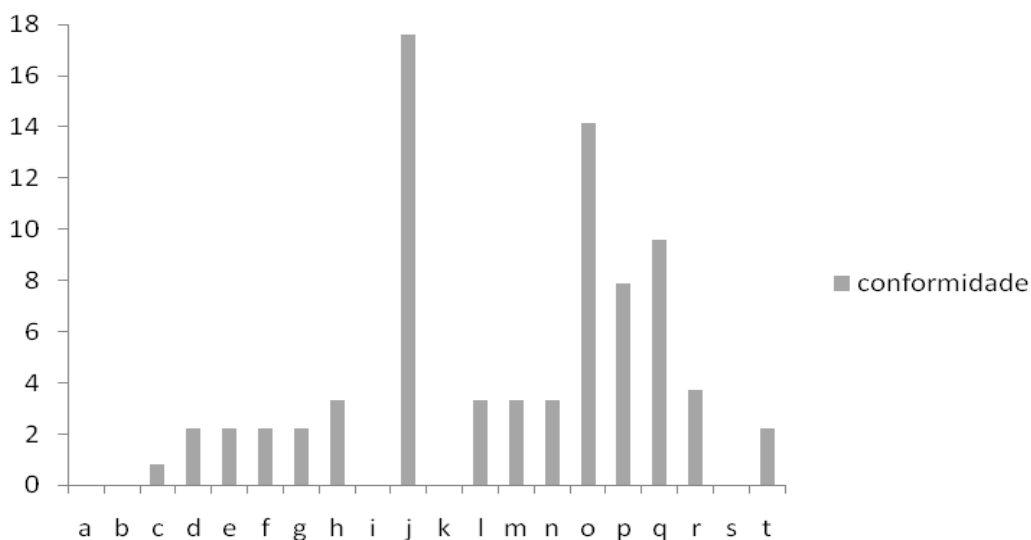


**Figura 4.** Análise de conformidade dos *check-list* inicial (i) e final (f) para os blocos referentes à edificações e instalações (B1); equipamentos, móveis e utensílios (B2); manipuladores (B3); produção e transporte de alimentos (B4) e documentação (B5) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.

(i)



(f)



**Figura 5.** Análise de conformidade para o bloco 1 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - edificações e instalações: área externa (a); acesso (b); área interna (c); piso (d); tetos (e); paredes e divisórias (f); portas (g); janelas e demais aberturas (h); escadas, elevadores de serviço e estruturas auxiliares (i); instalações sanitárias e vestiários para os manipuladores (j); instalações sanitárias para visitantes e outros (k); lavatórios na área de produção (l); iluminação e instalação elétrica (m); ventilação e climatização (n); higienização das instalações (o); controle integrado de vetores e pragas urbanas (p); abastecimento de água (q); manejo de resíduos (r); esgotamento de água (s); e “layout” (t) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.

No bloco 2, equipamentos, móveis e utensílios, o único sub-bloco que apresentou melhoria foi aquele relacionado à higienização de equipamentos e utensílios, o qual apresentou 19,62 % e 24,38 % de conformidade nas avaliações inicial e final, respectivamente. Os demais sub-blocos permaneceram com o mesmo índice de conformidade (Figura 6).

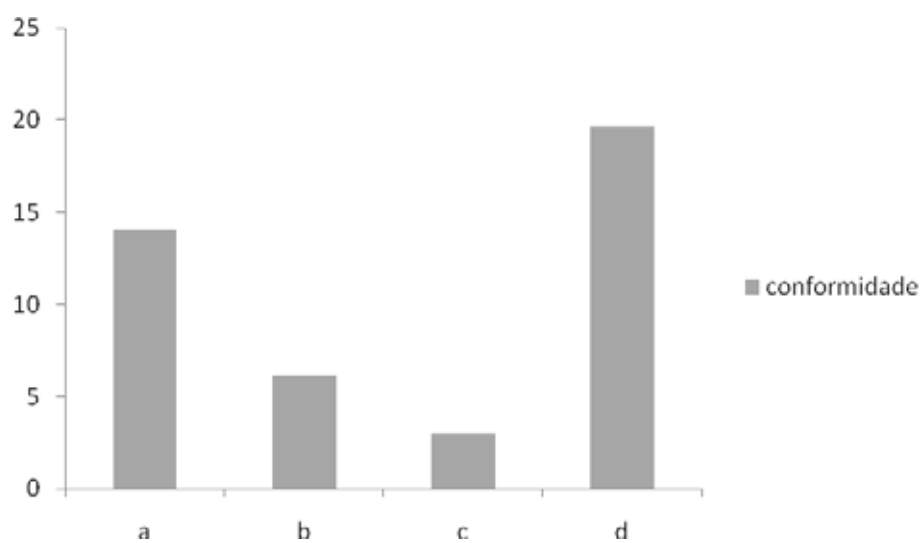
Para a retirada de umidade de vegetais minimamente processados é ideal a utilização de uma centrífuga, porém a microempresa em questão não possui este tipo de equipamento, o que pode contribuir para a contaminação microbiológica, pois a umidade presente pode criar condições ambientais propícias para a multiplicação microbiana.

Com relação aos manipuladores (bloco 3), de acordo com a Figura 7, os sub-blocos estado de saúde, equipamentos de proteção individual e programa de capacitação dos manipuladores e supervisão apresentaram total inconformidade no *check-list* inicial; já no final estes critérios apresentaram 15,00 %, 15,00 % e 20,00 % de conformidade, respectivamente. Os sub-blocos vestuário e hábitos higiênicos permaneceram com o mesmo índice de conformidade nas duas verificações, e assistência à saúde apresentou total inconformidade em ambas as avaliações.

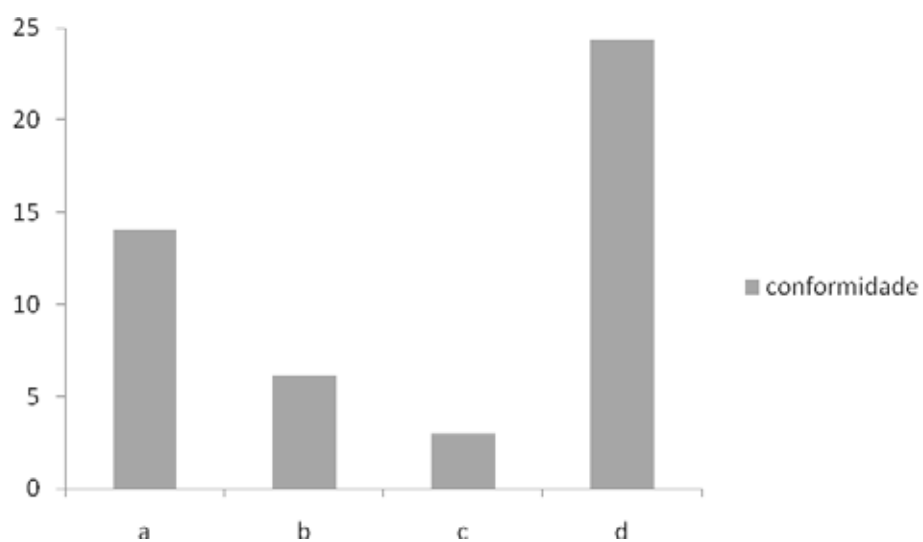
Para produção e transporte de alimentos (bloco 4), matéria-prima, ingredientes e embalagens, rotulagem e armazenamento do produto final e transporte do produto final, o percentual de conformidade aumentou de 17,35 %, 12,40 % e 6,61 % para 29,58 %, 15,20 % e 12,80 %, respectivamente (Figura 8). Fluxo de produção e controle de qualidade do produto final, em ambos os *check-list* aplicados, apresentaram total inconformidade.

Silva; Guerra, (2003) analisaram as condições de produção de frutos minimamente processados na cidade de Recife, e verificaram que toda a equipe de manipuladores recebeu treinamento específico quanto às normas das BPF, porém os critérios relacionados aos uniformes e calçados não atendiam as recomendações estabelecidas.

(i)

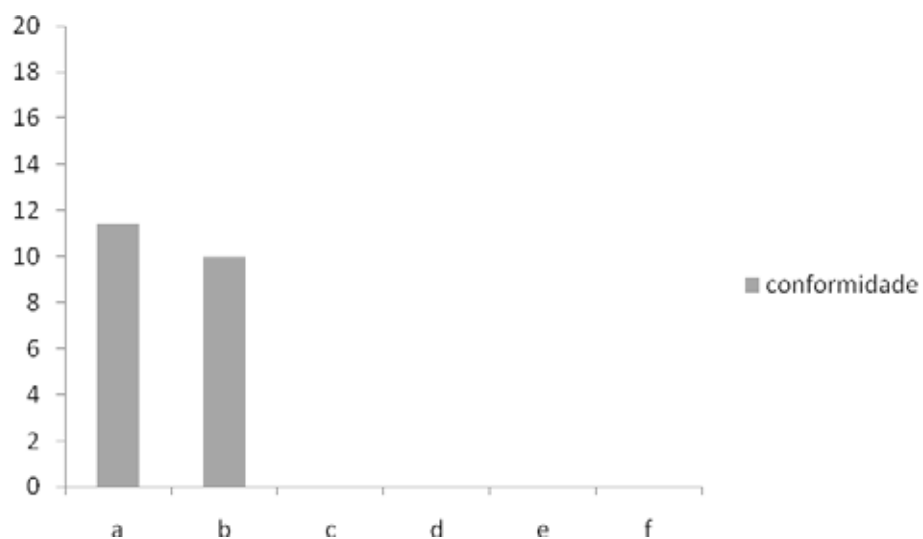


(f)

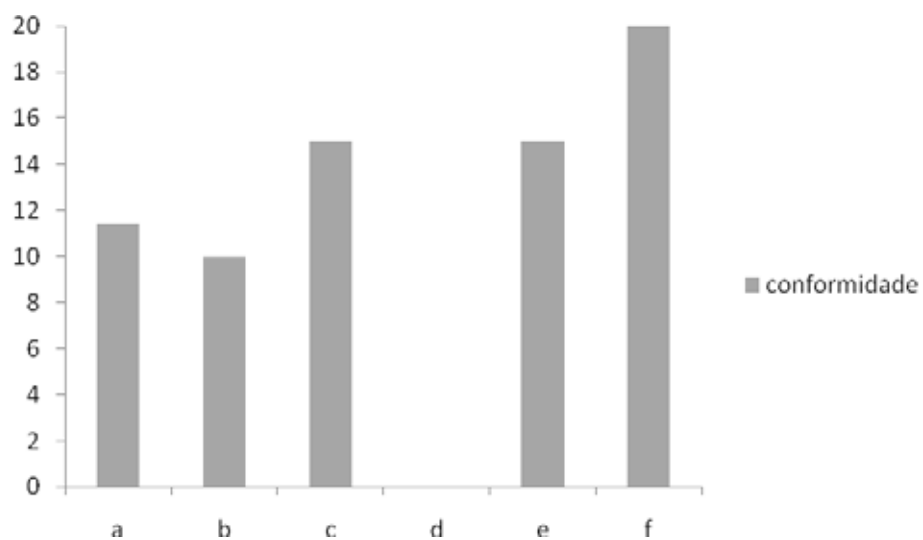


**Figura 6.** Análise de conformidades para o bloco 2 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - equipamentos, móveis e utensílios: equipamentos (a); móveis (b); utensílios (c); higienização de equipamentos e utensílios (d) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.

(i)

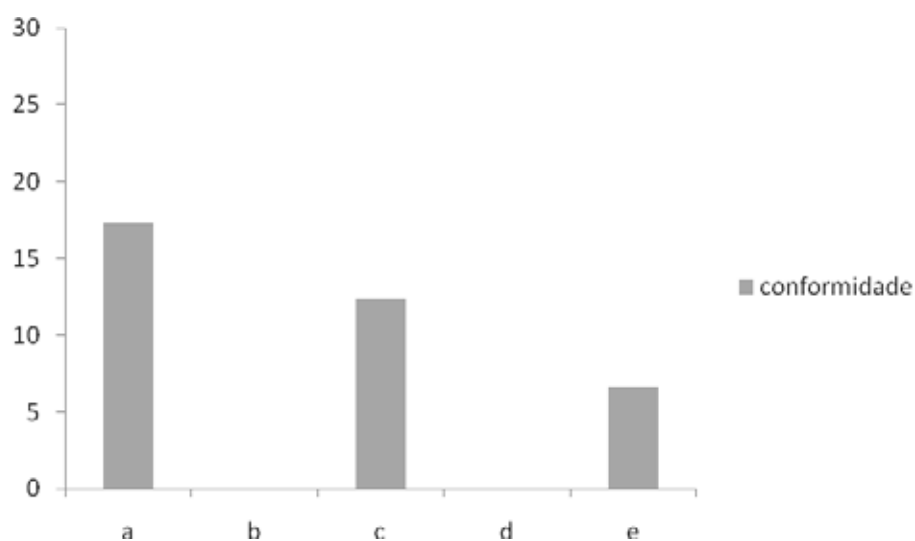


(f)

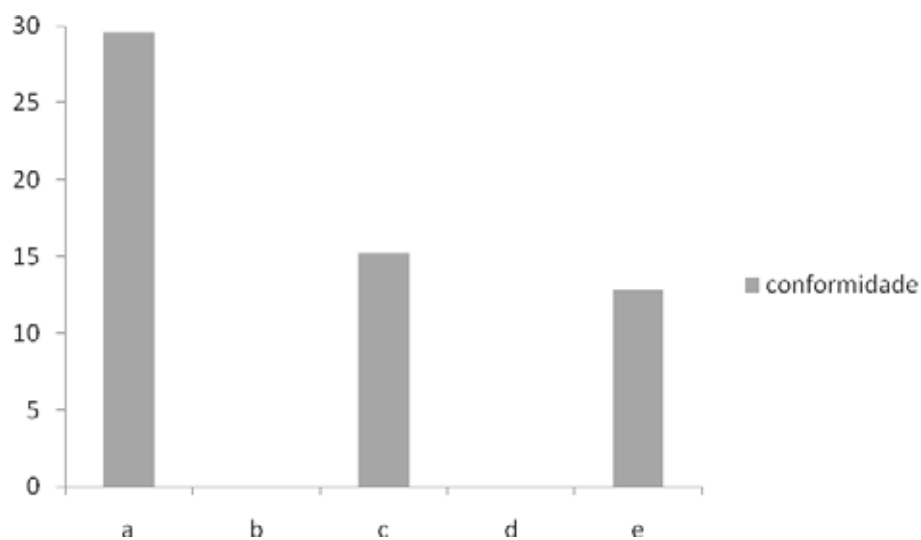


**Figura 7.** Análise de conformidades para o bloco 3 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - manipuladores: vestuários (a); hábitos higiênicos (b); estado de saúde (c); assistência à saúde (d); equipamentos de proteção individual (e); programa de capacitação dos manipuladores e supervisão (f) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.

(i)



(f)



**Figura 8.** Análise de conformidades para o bloco 4 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - produção e transporte de alimentos: matéria-prima, ingredientes e embalagens (a); fluxo de produção (b); rotulagem e armazenamento do produto final (c); controle de qualidade do produto final (d); transporte do produto final (e) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.

Cruz; Cenci; Maia, (2006) ao avaliarem os pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada, verificaram ausência de higienização periódica das mãos, matéria-prima e produto final expostos por demasiado período fora da refrigeração, tempo de centrifugação do produto não-padronizado e ausência de monitoramento da temperatura, concentração e tempo de contato do sanificante durante o processamento.

No bloco 5, documentação, observou-se para ambas as avaliações, 4,17 % de conformidade, relacionados aos Procedimentos Operacionais Padronizados. Em relação à existência do manual de BPF verificou-se total inconformidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Santos (2009), ao avaliar o índice de conformidade quanto à documentação de um laticínio de pequeno porte, verificando apenas 7,69 % de conformidade, também relacionado aos Procedimentos Operacionais Padronizados (POP).

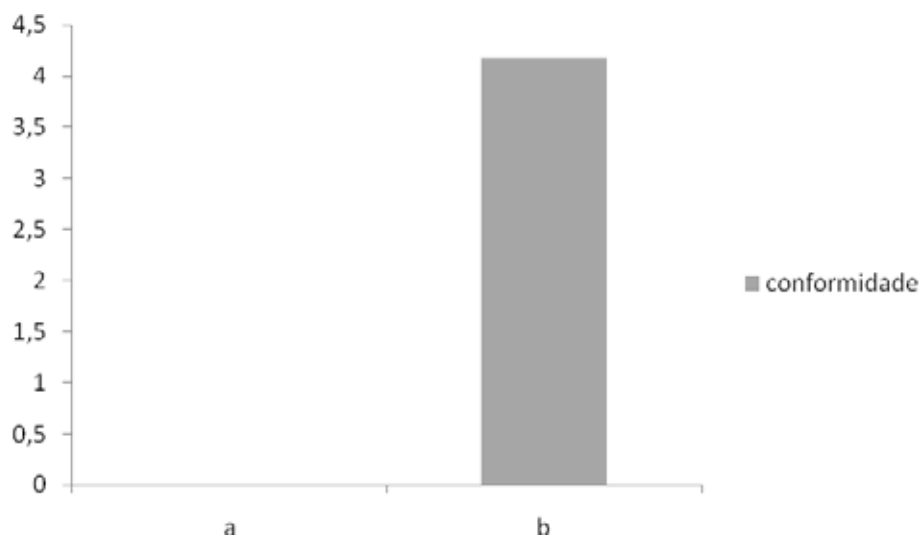
Piragine (2005) afirma que todas as etapas que compreendem a produção até o consumo do alimento, devem ser relevantes para a qualidade final do produto. Dentre diversos fatores, aqueles mais preocupantes estão relacionados aos descuidos com a saúde dos manipuladores, falta de higiene no manuseio e ausência de preservação adequada dos produtos alimentícios.

Os fatores que contribuem para tornar um alimento inseguro podem ser reduzidos consideravelmente por meio de treinamento adequado. As pessoas envolvidas na produção de alimentos, muitas vezes desconhecem relativos cuidados higiênico-sanitários que devem ser adotados, desconhecendo a possibilidade de serem portadores assintomáticos de microrganismos contaminantes (FORSYTHE, 2002).

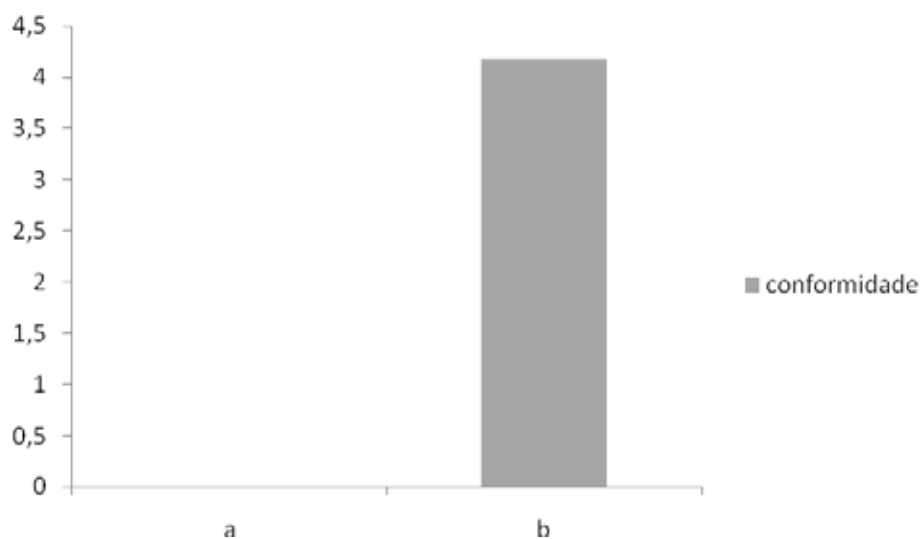
Equipamentos e utensílios com higienização deficiente também têm sido responsáveis, isoladamente ou associados a outros fatores, por surtos de doenças de origem alimentar ou por alterações em alimentos processados. A limpeza e desinfecção inadequada destes representam

um fator de risco para a contaminação dos alimentos (GERMANO et al., 2000; PIRAGINE, 2005).

(i)



(f)



**Figura 9.** Análise de conformidade para o bloco 5 dos *check-list* inicial (i) e final - documentação: manual de BPF (a); Procedimentos Operacionais Padronizados (b) da microempresa localizada em São José do Rio Preto - SP.



Chiarini; Andrade, (2001) ressaltam que é necessário proceder a higienização dos utensílios, equipamentos e do ambiente, incluindo superfícies, piso, paredes, janelas e portas, pois o ambiente possui fatores que podem favorecer a multiplicação de microrganismos, como água, pH neutro a ligeiramente ácido, oxigênio, nutrientes e temperatura próxima a 35°C.

Os resultados insatisfatórios apresentados nas avaliações realizadas neste estudo são preocupantes, pois afetam a qualidade do produto, aumentando riscos de contaminação por microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Diante disso, tornam-se necessárias adequações em todos os sub-blocos que apresentaram grande percentual de inconformidade.

É válido ressaltar que a melhoria observada na microempresa é de grande importância para assegurar a produção de alimentos seguros, evitando-se a veiculação de doenças e perdas econômicas significativas.

### **5.3. Identificação das leveduras**

As leveduras isoladas das amostras e identificadas estão apresentadas na Tabela 8 de acordo com a sua origem, sendo que os maiores percentuais correspondem à cenoura, couve, milho e couve-flor, os quais apresentam boa disponibilidade de nutrientes e umidade para o desenvolvimento de microrganismos (JAY, 2005).

As culturas identificadas correspondem às espécies *Arxula adeninovorans*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (Tabela 9).

A espécie *Cryptococcus laurentii* foi a mais freqüente, compreendendo 40 culturas (85,1 %), seguida por *Arxula adeninovorans* com 6 (12,8 %) e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* com 1 (2,1 %).

Nos resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação, observou-se que as leveduras apresentaram variações em relação à descrição padrão, como pode ser observado na Tabela 10.

As seis leveduras identificadas como *Arxula adeninovorans* diferiram da descrição padrão por crescerem em meio contendo inulina e galactitol (B4<sub>01</sub>; B6<sub>02</sub>; D3<sub>01</sub>; D3<sub>71</sub>; D6<sub>71</sub>; I5<sub>01</sub>), por não fermentarem maltose e lactose (D3<sub>01</sub>; D3<sub>71</sub>; D6<sub>71</sub>; I5<sub>01</sub>) e outras por não fermentarem somente a lactose (B4<sub>01</sub>; B6<sub>02</sub>).

**Tabela 8.** Distribuição das leveduras segundo a origem.

Vegetais minimamente processados	Códigos das culturas	Número de culturas	Porcentagens (n = 47)
Acelga	A4 <sub>01</sub> ; A4 <sub>02</sub> ; A4 <sub>03</sub> ; A6 <sub>01</sub>	04	8,5 %
Cenoura	B4 <sub>01</sub> ; B4 <sub>71</sub> ; B4 <sub>72</sub> ; B5 <sub>01</sub> ; B5 <sub>02</sub> ; B6 <sub>01</sub> ; B6 <sub>02</sub> ; B6 <sub>71</sub> ; B6 <sub>72</sub>	09	19,2 %
Couve	C4 <sub>01</sub> ; C4 <sub>02</sub> ; C4 <sub>03</sub> ; C4 <sub>71</sub> ; C5 <sub>01</sub> ; C5 <sub>02</sub> ; C6 <sub>01</sub> ; C6 <sub>02</sub>	08	17,0 %
Milho	D3 <sub>01</sub> ; D3 <sub>71</sub> ; D4 <sub>01</sub> ; D4 <sub>71</sub> ; D5 <sub>01</sub> ; D5 <sub>02</sub> ; D6 <sub>01</sub> ; D6 <sub>71</sub>	08	17,0 %
Quiabo	E3 <sub>01</sub> ; E3 <sub>71</sub>	02	4,3 %
Repolho	F3 <sub>01</sub>	01	2,1 %
Vagem	G3 <sub>01</sub> ; G5 <sub>01</sub> ; G5 <sub>71</sub> ; G6 <sub>01</sub>	04	8,5 %
Couve-flor	H4 <sub>01</sub> ; H4 <sub>02</sub> ; H4 <sub>03</sub> ; H4 <sub>71</sub> ; H6 <sub>01</sub> ; H6 <sub>02</sub> ; H6 <sub>03</sub> ; H6 <sub>04</sub>	08	17,0 %
Abóbora	I4 <sub>01</sub> ; I4 <sub>71</sub> ; I5 <sub>01</sub>	03	6,4 %

**Tabela 9.** Frequência relativa das três espécies de leveduras isoladas.

Leveduras	Código das culturas	Número de culturas	Porcentagens (n = 47)
<i>Arxula adeninovorans</i>	B4 <sub>0</sub> 1; B6 <sub>0</sub> 2; D3 <sub>0</sub> 1; D3 <sub>7</sub> 1; D6 <sub>7</sub> 1; I5 <sub>0</sub> 1	06	12,8 %
<i>Cryptococcus laurentii</i>	A4 <sub>0</sub> 1; A4 <sub>0</sub> 2; A4 <sub>0</sub> 3; A6 <sub>0</sub> 1; B4 <sub>7</sub> 2; B5 <sub>0</sub> 1; B5 <sub>0</sub> 2; B6 <sub>0</sub> 1; B6 <sub>7</sub> 1; B6 <sub>7</sub> 2; C4 <sub>0</sub> 1; C4 <sub>0</sub> 2; C4 <sub>0</sub> 3; C4 <sub>7</sub> 1; C5 <sub>0</sub> 1; C5 <sub>0</sub> 2; C6 <sub>0</sub> 1; C6 <sub>0</sub> 2; D4 <sub>0</sub> 1; D4 <sub>7</sub> 1; D5 <sub>0</sub> 1; D5 <sub>0</sub> 2; D6 <sub>0</sub> 1; E3 <sub>0</sub> 1; E3 <sub>7</sub> 1; F3 <sub>0</sub> 1; G3 <sub>0</sub> 1; G5 <sub>0</sub> 1; G5 <sub>7</sub> 1; G6 <sub>0</sub> 1; H4 <sub>0</sub> 1; H4 <sub>0</sub> 2; H4 <sub>0</sub> 3; H4 <sub>7</sub> 1; H6 <sub>0</sub> 1; H6 <sub>0</sub> 2; H6 <sub>0</sub> 3; H6 <sub>0</sub> 4; I4 <sub>0</sub> 1; I4 <sub>7</sub> 1	40	85,1 %
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	B4 <sub>7</sub> 1	01	2,1 %

As quarenta leveduras de *Cryptococcus laurentii* diferiram da descrição padrão por assimilar nitrato e se desenvolver à 40°C (A4<sub>0</sub>1; A4<sub>0</sub>2; A6<sub>0</sub>1; B4<sub>7</sub>2; B5<sub>0</sub>1; B6<sub>0</sub>1; B6<sub>7</sub>1; B6<sub>7</sub>2; C4<sub>0</sub>1; C4<sub>0</sub>2; C4<sub>0</sub>3; C4<sub>7</sub>1; C5<sub>0</sub>1; C6<sub>0</sub>1; C6<sub>0</sub>2; D4<sub>0</sub>1; D5<sub>0</sub>1; D5<sub>0</sub>2; D6<sub>0</sub>1; E3<sub>0</sub>1; G3<sub>0</sub>1; G5<sub>0</sub>1; G5<sub>7</sub>1; G6<sub>0</sub>1; H4<sub>0</sub>2; H4<sub>0</sub>3; H4<sub>7</sub>1; H6<sub>0</sub>1; H6<sub>0</sub>3; H6<sub>0</sub>4; I4<sub>0</sub>1; I4<sub>7</sub>1) e outras apenas por crescerem em meio contendo nitrato (A4<sub>0</sub>3; B5<sub>0</sub>2; C5<sub>0</sub>2; D4<sub>7</sub>1; E3<sub>7</sub>1; F3<sub>0</sub>1; H4<sub>0</sub>1; H6<sub>0</sub>2).

Apenas uma cultura foi identificada como *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (B4<sub>7</sub>1) e esta diferiu do padrão por crescer em meio contendo nitrato, M-inositol e se desenvolver à 40°C.

Conforme Kurtzman; Fell, (1998) a espécie *Arxula adeninovorans* fermenta a glicose, galactose, sucrose, maltose, lactose, rafinose e trealose, e é proveniente de solos e de insetos. A *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* possui a capacidade de alterar o sabor do alimento e, é comumente encontrada em alimentos ácidos.

*Cryptococcus laurentii* é uma espécie não fermentativa, com capacidade de desenvolvimento em elevadas concentrações de ácido e sal (KURTZMAN; FELL, 1998). Esta levedura apresenta cor esbranquiçada, vermelha ou laranja e pode ser encontrada em vegetais e solos, peixes marinhos, camarão e carne de gado crua moída (JAY, 2005).

**Tabela 10.** Resultado dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação das leveduras isoladas (continua).

Prova / cultura	<i>Arxula adeninovorans</i>						<i>Cryptococcus laurentii</i>	
	B4 <sub>01</sub>	B6 <sub>02</sub>	D3 <sub>01</sub>	D3 <sub>71</sub>	D6 <sub>71</sub>	I5 <sub>01</sub>	A4 <sub>01</sub>	A4 <sub>02</sub>
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+
F. da glicose	+	+	+	+	+	+	-	-
F. da maltose	+	+	-	-	-	-	-	-
F. da sacarose	+	+	+	+	+	+	-	-
F. da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo. 100 ppm	+	+	+	+	+	+	-	+
Ciclo. 1000 ppm	+	+	+	+	+	+	-	+
Glicose 50 %	+	+	+	+	+	+	-	-
NaCl 10 %	+	+	+	-	+	+	+	+
Sínt. Amido	+	+	+	+	+	+	+	+











**Tabela 10.** Resultado dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação das leveduras isoladas.

Prova / cultura	<i>Cryptococcus laurentii</i>		<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>
	I4 <sub>0</sub> 1	I4 <sub>7</sub> 1	B4 <sub>7</sub> 1
Colônias <i>pink</i>	-	+	-
Esporos	+	+	+
F. da glicose	+	-	+
F. da maltose	-	-	+
F. da sacarose	-	-	+
F. da lactose	-	-	+
Glicose	+	+	+
Galactose	+	+	+
L-sorbose	+	+	+
Glicosamina	+	+	+
D-xilose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+
D-arabinose	+	+	+
L-ramnose	+	+	+
Sacarose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Trealose	+	+	+
Celobiose	+	+	+
Salicina	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Rafinose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Inulina	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+
Glicerol	+	+	+
Eritritol	+	+	+
Ribitol	+	+	+
D-glucitol	+	+	+
D-manitol	+	+	+
Galactitol	+	+	+
M-inositol	+	+	+
Citrato	+	+	+
Etanol	+	+	+
Nitrato	+	+	+
35°C	+	+	-
40°C	+	+	+
45°C	+	-	+
Ciclo. 100 ppm	-	+	-
Ciclo. 1000 ppm	-	+	-
Glicose 50 %	+	+	+
NaCl 10 %	+	+	+
Sínt. Amido	+	+	+

As hortaliças apresentam uma elevada quantidade de água e nutrientes propiciando o desenvolvimento de microrganismos, sendo que o *Cryptococcus* sp. é um dos gêneros de leveduras mais encontrados em hortaliças, juntamente com *Rhodotorula* sp., *Candida* sp. e *Kloeckera* sp.. A contaminação pode ocorrer por meio do solo, rico nesses microrganismos, os quais podem chegar ao alimento pelo vento ou por insetos. A chuva pode arrastar terra elevando a carga microbiana, além de aumentar a umidade e favorecer o crescimento de fungos em até 72% (PORTE; MAIA, 2001).

#### **5.4. Ensaio de resistência ao hipoclorito de sódio e ozônio**

A microempresa utilizou o hipoclorito de sódio na concentração de 100 ppm no período em que foram realizadas as três primeiras coletas. Posteriormente, foi instalado um gerador de ozônio no tanque de sanitização e este antimicrobiano passou a ser utilizado na concentração de 0,50 ppm. Desta forma, as leveduras isoladas foram submetidas às concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm de hipoclorito de sódio e 0,50 e 0,25 ppm de ozônio. É válido ressaltar que não foi possível realizar o teste com o dobro da concentração de ozônio, visto que o gerador se encontrava regulado apenas para a concentração de 0,50 ppm.

Todas as leveduras isoladas apresentaram resistência a todas as concentrações testadas de hipoclorito de sódio (50, 100, 200 e 400 ppm) e de ozônio (0,25 e 0,50 ppm). Esses resultados são insatisfatórios, mostrando que as concentrações utilizadas no processamento mínimo são ineficientes para diminuir ou eliminar tais microrganismos.

Galetti; Azevedo; Azevedo, (2005) ao testarem o perfil de resistência de microrganismos isolados de manipuladores, superfícies de contato e alimentos, durante o processo de produção de frango xadrez e alcatra ao molho, verificaram que o hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm não foi eficaz contra nenhuma das cepas testadas.

Conforme Ayhan; Chism; Richter, (1998) o aumento da concentração de hipoclorito de sódio para 2000 ppm na desinfecção de melões “Cantaloupe” não provocou redução adicional na população de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras durante 20 dias de armazenamento a 2,2°C.

De acordo com Chiattoni; Torre; Zambiasi, (2008) as concentrações de 0,50 e 1,0 ppm de ozônio são capazes de reduzir consideravelmente a carga microbiana na etapa de sanificação de carne bovina maturada. Já no tratamento de carcaças de frango, a água ozonizada foi eficiente nas concentrações de 3,0 e 3,5 ppm, reduzindo 58,6 % de bolores e leveduras.

Cardoso et al. (2003) ao avaliarem a ação do ozônio no tratamento de água, constatou que a concentração de 4 ppm foi capaz de diminuir grande parte da microbiota contaminante presente.

A ação germicida do ozônio varia de acordo com o tipo de microrganismo, sendo este mais efetivo contra células vegetativas de bactérias do que esporos ou fungos. Esse sanitizante também combate algumas espécies de vírus, como o da hepatite A, influenza A, estomatite vesicular e rinotraqueíte (CHIATTONE; TORRE; ZAMBIAZI, 2008).

Silva et al. (2003) ressaltam que é importante considerar o fato de que desinfetantes de marcas comerciais distintas podem apresentar diferenças na eficácia antimicrobiana, tornando necessário o monitoramento da qualidade dos produtos disponíveis no mercado, garantindo segurança na etapa de sanitização.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados das análises dos aspectos higiênico-sanitários de vegetais minimamente processados produzidos por uma microempresa localizada no município de São José do Rio Preto - SP, e do perfil de resistência das leveduras isoladas, permitem inferir que:

- Nenhuma amostra de água utilizada no processamento encontrou-se em inconformidade para bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes e presença de *Escherichia coli*;
- Todas as amostras de vegetais (100 %) não apresentaram inconformidade perante a legislação para coliformes termotolerantes e para *Salmonella* spp.
- Para a bactéria *Escherichia coli* foi verificada a sua presença em 13 % das amostras;
- Apesar da ausência de padrão legal para coliformes totais, 38 % das amostras apresentaram resultados elevados (1100 e >1100);
- Altas contagens de bolores e leveduras foram constatadas em todas as amostras de vegetais;
- A partir da avaliação das BPF, constatou-se que a microempresa apresentou significativa melhora, aumentando seu percentual de conformidade de 49,00 para 89,79 %, se classificando como muito bom.
- O bloco correspondente à documentação foi o que apresentou menor índice de conformidade nas duas avaliações;
- Em relação às 47 leveduras isoladas, 85,1 % correspondem à *Cryptococcus laurentii*, 12,8 % à *Arxula adeninovorans* e 2,1 % à *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*;
- Todas as leveduras (100 %) apresentaram resistência ao hipoclorito de sódio e ozônio nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm, e 0,25 e 0,5 ppm, respectivamente;

- Mesmo que todas as amostras encontrem-se em conformidade para coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp., valores elevados de coliformes totais e bolores e leveduras indicam falhas durante o manufatura do produto;
- A resistência das leveduras aos sanitizantes é preocupante, pois tais microrganismos podem deteriorar o alimento, diminuindo sua vida de prateleira;
- Devem ser adotadas medidas adequadas para a melhoria dos critérios que apresentaram grande inconformidade, pois tais ferramentas são indispensáveis para a garantia da segurança e do bem estar dos consumidores.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILA, J. S. D.; SASAKI, F. F.; HEIFFIG, L. S.; ONGARELLI, M. G.; GALLO, C. R. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 75 - 78, jan. / mar., 2006.

AKUTSU, R. C.; ANDRADE, N. J.; ARCURI, E. F.; CHAVES, J. B. P.; MARTINS, A. D. O. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 419 - 427, 2005.

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 6, 749 - 751, 2002.

AMSON, G. V. **Comércio ambulante de alimentos em Curitiba: perfil de vendedores e propostas para programa de boas práticas higiênicas na manipulação de alimentos**. Curitiba, 2005. 150f. Dissertação (Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná.

ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETTI, B. C.; SOUZA FILHO, M. S. M.; BORGES, M. F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi ‘pérولا’ minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 157 - 160, abr., 2005.

AYHAN, Z.; CHISM, G. W.; RICHTER, E. R. The shelf-life of minimally processed fresh cut melons. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 21, n. 1, p. 29 - 40, 1998.

BARNET, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge, Cambridge University Press, 1983.

BARNET, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2 ed., Cambridge, Cambridge University Press, 1990.

BEERLI, K. M. C.; BOAS, E. V. B. V.; PICCOLI, R. H. Influência de sanificantes nas características microbiológicas, físicas e físico-químicas de cebola (*Allium cepa* L.) minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 107 - 112, jan. / fev., 2004.

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 de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 197 - 201, mai. / ago., 2001.

BONNAS, D. S.; SILVA, C. C.; SILVA, S. A.; FERREIRA, I. M. Qualidade higiênico-sanitária de vegetais minimamente processados, comercializados no município de Uberlândia, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 133, p. 100 - 103, jul., 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7 - E, 10 jan., 2001.

BRASIL. Resolução RDC n. 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 de nov. de 2002, Seção 1, p. 4 - 21.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 de mar. de 2004.

BRITO, C. S.; ROSSI, D. A. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja *in natura* e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia - MG. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 133 - 140, jan. / abr., 2005.

CABRINI, K. T.; SIVIERO, A. R.; HONÓRIO, E. F.; OLIVEIRA, L. F. C.; VENÂNCIO, P. C. 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 - 92, abri., 2002.

CARDOSO, C. C.; VEIGA, S. M. O. M.; NASCIMENTO, L. C.; FIORINI, J. E.; AMARAL, L. A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 59 - 61, jan. / abr., 2003.



CHIARINI, E.; ANDRADE, C. S. Levantamento de procedimentos higiênicos adotados em cozinhas residenciais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 121, p. 34 - 37, 2001.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 341 - 349, jul. / set., 2008.

CHITARRA, M. I. F. **Processamento mínimo de frutos e hortaliças**. Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 1998. 87 p.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. Lavras: UFLA, 2005. 785p.

CRUZ, A. G.; CENCI, S. A.; MAIA, M. C. A. Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 104 - 109, jan.. / mar., 2006.

D'AGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C.; MIRANDA, C. A. S.; FERREIRA, A. P. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 791 - 798, jul. / set., 2000.

DAMASCENO, K. S. F. S. C.; STAMFORD, T. L. M.; ALVES, M. A. Vegetais minimamente processados: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 85, p. 20 - 25, jun., 2001.

DELAQUIS, P. J.; FUKUMOTO, L. R.; TOIVONEN, P. M. A.; CLIFF, M. A. Implications of wash water chlorination and temperature for the microbiological and sensory properties of fresh-cut iceberg lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, Summerland, v. 31, p. 81 - 91, 2004.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M. C. D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 207 - 211, abr. / jun., 2004.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERREIRA, M. G. A. B.; BAYMA, A. B.; MARTINS, A. G. L. A.; GARCIA JÚNIOR, A. V.; MARINHO, S. C. Aspectos higiênico-sanitários de legumes e verduras minimamente processados e congelados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 49 - 55, mar., 2003.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1 ed, Porto Alegre: Artmed, 2002, 424 p.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes

fecais, alumínio e nitrato. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 651 - 660, mai. / jun., 2001.

FURLANETO, L.; SANTINI, M. S.; VELASCO, F. A. S. Análise microbiológica de vegetais e hortaliças minimamente processados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 131, p. 68 - 71, mai., 2005.

FURTUNATO, A. A.; MAGALHÃES, M. M. A.; MARIA, Z. L. Estudo do feijão verde (*Vigna unguiculata* (L) Walp) minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 299 - 301, set. / dez., 2000.

GALETTI, F. C. S.; AZEVEDO, A. P.; AZEVEDO, R. V. P. Avaliação do perfil de sensibilidade a antissépticos, desinfetantes e antibióticos (resistograma), de bactérias isoladas de manipuladores, superfícies de contato e alimentos, durante o processo de produção de frango xadrez e alcatra ao molho. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 91 - 99, mar., 2005.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L.; KAMEI, C. A. K.; ABREU, E. S.; RIBEIRO, E. R.; SILVA, K. C.; LAMARDO, L. C. A.; ROCHA, M. F. G.; VIEIRA, V. K. I.; KAWASAKI, V. M. Manipuladores de alimentos: capacitar? É preciso? Regular? Será preciso??? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 78, p. 18 - 22, nov. / dez., 2000.

GUIMARÃES, A.G.; LEITE, C.C.; TEIXEIRA, L. D. S.; SANT.ANNA, M. E. B.; ASSIS, P.N. Detecção de *Salmonella* spp. em alimentos e manipuladores envolvidos em um surto de

infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n. 1, p. 1 - 4, 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 711p., 2005.

KREEGER VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science Publication, 1984.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomy study**. 4. ed. [S.I.]: Elsevier, 1998.

LANITA, C. S.; SILVA, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Braz. J. Food Technol**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 182 - 189, jul. / set., 2008.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 63, p. 399 - 406, 1952.

LUND, D. G.; PETRINI, L. A.; ALEIXO, J. A. G.; ROMBALDI, C. V. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1431 - 1435, nov. / dez., 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Hall Person. 624 p., 2004.

MELLO, J. C.; DIETRICH, R.; MEINERT, E. M.; TEIXEIRA, E.; AMANTE, E. R. Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida de prateleira de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 418 - 426, set. / dez., 2003.

MONDARDO, R. I.; SENS, M. L.; MELO FILHO, L. C. M. Pré-tratamento com cloro e ozônio para remoção de cianobactérias. **Eng. sanit. ambient**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 337 - 342, out / dez., 2006.

MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. 1 ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p.

OKURA, M. H.; MARIANO, A. M. S. E.; TEIXEIRA, A. N. S. Eficiência de sanitizantes no tratamento “minimamente processado” de alface cultivada e meio hidropônico. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 142, p. 105 - 113, jul., 2006.

OLIVEIRA, E. C. M.; VALLE, R. H. P. Aspectos microbiológicos dos produtos hortícolas minimamente processados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 78 / 79, p. 50 - 54, nov. / dez., 2000.

OLIVEIRA, M. A.; PANTAROTO, S.; CEREDA, M. P. Efeito da sanitização e de agente antioxidante em raízes de mandioca minimamente processadas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 339 - 344, jul. / dez., 2003.

OLIVEIRA, A. M. C.; PINTO, G. A. S.; BRUNO, L. M.; AZEVEDO, E. H. F. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de alface minimamente processada, comercializada em Fortaleza, CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 80 - 85, set., 2005.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. I. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos**: Componente dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1. 294 p.

PASCHOALATO, C. F. P. R.; TRIMAILOVAS, M. R.; BERNARDO, L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. **Eng. sanit. ambient**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 313 - 322, jul / set., 2008.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: Conceitos e Aplicações. 2 ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, v. 2, 1997. 517 p.

PEREIRA, J. L.; MIYA, N.; MAISTRO, L. C. Importância da enumeração rápida de bactérias patogênicas em vegetais folhosos minimamente processados: uma análise. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 15 - 21, out., 2001.

PEREZ, R.; RAMOS, A. M.; BINOTI, M. L.; SOUSA, P. H. M.; MACHADO, G. M.; CRUZ, I. B. Perfil dos consumidores de hortaliças minimamente processadas de Belo Horizonte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 441 - 446, out. / dez., 2008.

PILON, L.; OETTERER, M.; GALLO, C. R.; SPOTO, M. H. F. Shelf life of minimally processed carrot and green pepper. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 150 - 158, jan. / mar., 2006.

PINELI, L. L. O.; MORETTI, C. L.; ALMEIDA, G. C.; NASCIMENTO, A. B. G.; ONUKI, A. C. A. Associação de atmosfera modificada e antioxidantes reduz o escurecimento de batatas “Ágata” minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 993 - 999, out. / dez., 2005.

PINELI, L. L. O.; ARAÚJO, W. M. C. Produção, qualidade e segurança sanitária de vegetais minimamente processados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 141, p. 55 - 60, mai. / jun., 2006.

PINHEIRO, N. M. S.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 153 - 156, abr., 2005.

PIRAGINE, K. O. **Aspectos higiênicos e sanitários do preparo da merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba**. Curitiba, 2005. 122f. Dissertação (Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná.

PIRES, E. F.; SHINOHARA, N. K. S.; FREITAS, F.; SILVEIRA, K. C.; PEREZ, A. Estabilidade de vegetais minimamente processados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 147, p. 30 - 33, dez., 2006.

PORTE A; MAIA LH. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim do CEPPA**, v. 19, n. 1, p. 105 - 118, jan. / jun., 2001.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 455 p. 2005.

RINALDI, M. M.; BENEDETTI, B. C.; CALORE, L. Efeito da embalagem e temperatura de armazenamento em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 480 - 486, jul. / set., 2005.

RINALDI, M. M.; BENEDETTI, B. C.; MORETTI, C. L. Vida útil de repolho minimamente processado em atmosfera modificada e refrigeração. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 144 - 152, abr. / jun., 2008.

ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P. Implementação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) para o controle de qualidade de produtos minimamente processados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 123, p. 30 - 36, ago., 2004.

ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P.; DIONÍZIO, F. L.; RIBEIRO, A. C.; BEERLI, K. M. Indicadores de contaminação ambiental e de condições higiênicas insatisfatórias de processamento, em hortaliças minimamente processadas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 74 - 84, jul., 2004.

ROVERSI, R. M.; MASSON, M. L. Influência da embalagem sobre a qualidade sensorial da alface crespa minimamente processada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 136, p. 41 - 47, out., 2005.



SANT'ANA, A.; AZEREDO, D. P.; COSTA, M.; MACEDO, V. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 80 - 84, out., 2002.

SANTOS, H. S.; MURATORI, M. C. S.; LOPES, J. B. Condições higiênico-sanitárias de cenoura minimamente processada comercializada em supermercados de Teresina, PI. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 131, p. 86 - 90, mai., 2005.

SANTOS, V. A. Q. **Perfil microbiano, físico-químico e análise das Boas Práticas de Fabricação (BPF) de queijos minas frescal e ricota**. São José do Rio Preto, 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

SASAKI, F. F.; AGUILA, J. S. D.; GALLO, C. R.; ORTEGA, E. M. M.; JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. Alterações fisiológicas, qualitativas e microbiológicas durante o armazenamento de abóbora minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 170 - 174, abr. / jun., 2006.

SEABRA, G. F. S.; DELIZA, R.; CENCI, S. A.; GOMES, C. A. O.; GONÇALVES, E. B.; Nota prévia - Efeito da temperatura e de diferentes atmosferas nas características sensoriais do brócolis minimamente processado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 137 - 145, 2001.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM COMERCIAL - SENAC. **Manual de elementos de apoio para o sistema APPCC**. Rio de Janeiro: SENAC, 2001. 282p.

SEIXAS, F. R. F. **Verificação das boas práticas de fabricação (BPF) e análise da qualidade microbiológica de saladas adicionadas de maionese comercializadas na cidade de São José do Rio Preto - SP.** São José do Rio Preto, 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167 - 173, mai. / ago., 2003.

SILVA, M. Z. T.; GUERRA, N. B. Avaliação das condições de produção de frutos minimamente processados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 29 - 36, ago., 2003.

SILVA, S. R. P.; VERDIN, S. E. F.; PEREIRA, D. C.; SCHATKOSKI, A. M.; ROTT, M. B.; CORÇÃO, G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 594 - 598, 2007a.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela: 3 ed., 2007b. 544 p.

SHEREE LIN, C. C.; FUNG, D. Y. C.; COX, N. A. Conventional and rapid methods for yeasts identification. **Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 14, n. 4, p. 273-289, 1987.

SREBERNICH, S. M. Utilização de dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 744 - 750, out. / dez., 2007.

SYDOW, A. C. M. D. G.; COOGAN, J. A.; MORENO, A. M.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.4, p. 401 - 407, out. / dez., 2006.

TEIXEIRA, G. H. A.; DURIGAN, J. F.; MATTIUZ, B.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Processamento mínimo de mamão ‘formosa’. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 47 - 50, jan. / abr., 2001.

TOMICH, R. G. P.; TOMICH, T. R.; AMARAL, C. A. A.; JUNQUEIRA, R. G.; PEREIRA, A. J. G. Metodologia para avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 115 - 120, jan. / mar., 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 894 p., 2005.

VIEITES, R. L.; EVANGELISTA, R. M.; CAMPOS, A. J.; MOREIRA, G. C. Efeito da radiação gama na sanitização da manga minimamente processada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 68 -73, set., 2005.

VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; GALLO, C. R.; MORETTI, C. L.; JACOMINO, A. P. Efeito do momento de sanitização sobre atributos físico-químicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 718 - 721, out. / dez., 2004a.

VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; GALLO, C. R.; SCHIAVINATO, M. A.; MORETTI, C. L.; JACOMINO, A. P. Aspectos fisiológicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n. 10, p. 1027 - 1032, out., 2004b.

WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**. New York: Chapman & Hall, 1994. 368 p.

ZACARI, C. Z.; SHIRAHIGUE, L. D.; GONÇALVES, M. F. V.; GALLO, C. R.; SPOTO, M. H. F. Qualidade do repolho minimamente processado, submetido a diferentes concentrações de cloro. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 155, p. 67 -71, out., 2007.

## 8. ANEXOS

### ANEXO A - Lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos.

NÚMERO/ANO:			
A - IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA:			
B - AVALIAÇÃO	SIM	NÃO	NA*
1. EDIFICAÇÃO E INSTALAÇÕES			
1.1 área externa			
1.1.1 Área externa livre de focos de insalubridade, de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente, de vetores e outros animais no pátio e vizinhança; de focos de poeira; de acúmulo de lixo nas imediações, de água estagnada, dentre outros.			
1.1.2 Vias de acesso interno com superfície dura ou pavimentada, adequada ao trânsito sobre rodas, escoamento adequado e limpas.			
1.2 acesso:			
1.2.1 Direto, não comum a outros usos (habitação).			
1.3 área interna			
1.3.1 Área interna livre de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente.			
1.4 piso			
1.4.1 Material que permite fácil e apropriada higienização (liso, resistente, drenados com declive, impermeável e outros).			
1.4.2 Em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas, buracos e outros).			
1.4.3 Sistema de drenagem dimensionado adequadamente, sem acúmulo de resíduos. drenos, ralos sifonados e grelhas colocados em locais adequados de forma a facilitar o escoamento e proteger contra a entrada de baratas, roedores etc.			
B - avaliação	sim	não	na*
1.5 tetos			
1.5.1 Acabamento liso, em cor clara, impermeável, de fácil limpeza e, quando for o caso, desinfecção.			

1.5.2 Em adequado estado de conservação (livre de trincas, rachaduras, umidade, bolor, descascamentos e outros).			
1.6 paredes e divisórias			
1.6.1 Acabamento liso, impermeável e de fácil higienização até uma altura adequada para todas as operações. de cor clara.			
1.6.2 Em adequado estado de conservação (livres de falhas, rachaduras, umidade, descascamento e outros).			
1.6.3 Existência de ângulos abaulados entre as paredes e o piso e entre as paredes e o teto.			
1.7.1 Com superfície lisa, de fácil higienização, ajustadas aos batentes, sem falhas de revestimento.			
1.7 portas			
1.7.2 Portas externas com fechamento automático (mola, sistema eletrônico ou outro) e com barreiras adequadas para impedir entrada de vetores e outros animais (telas milimétricas ou outro sistema).			
1.7.3 Em adequado estado de conservação (livres de falhas, rachaduras, umidade, descascamento e outros).			
1.8 janelas e outras aberturas			
1.8.1 Com superfície lisa, de fácil higienização, ajustadas aos batentes, sem falhas de revestimento.			
1.8.2 Existência de proteção contra insetos e roedores (telas milimétricas ou outro sistema).			
1.8.3 Em adequado estado de conservação (livres de falhas, rachaduras, umidade, descascamento e outros).			
1.9 Escadas, elevadores de serviço, montacargas e estruturas auxiliares			
1.9.1 Construídos, localizados e utilizados de forma a não serem fontes de contaminação.			
1.9.2 de material apropriado, resistente, liso e impermeável, em adequado estado de conservação.			
1.10 instalações sanitárias e vestiários para os manipuladores			
1.10.1 quando localizados isolados da área de produção, acesso realizado por			

passagens cobertas e calçadas.			
1.10.2 independentes para cada sexo (conforme legislação específica), identificados e de uso exclusivo para manipuladores de alimentos.			
1.10.3 instalações sanitárias com vasos sanitários; mictórios e lavatórios íntegros e em proporção adequada ao número de empregados (conforme legislação específica).			
1.10.4 instalações sanitárias servidas de água corrente, dotadas preferencialmente de torneira com acionamento automático e conectadas à rede de esgoto ou fossa séptica.			
1.10.5 ausência de comunicação direta (incluindo sistema de exaustão) com a área de trabalho e de refeições.			
1.10.6 portas com fechamento automático (mola, sistema eletrônico ou outro).			
1.10.7 pisos e paredes adequadas e apresentando satisfatório estado de conservação.			
1.10.8 iluminação e ventilação adequadas.			
1.10.9 instalações sanitárias dotadas de produtos destinados à higiene pessoal: papel higiênico, sabonete líquido inodoro anti-séptico ou sabonete líquido inodoro e anti-séptico, toalhas de papel não reciclado para as mãos ou outro sistema higiênico e seguro para secagem.			
1.10.10 presença de lixeiras com tampas e com acionamento não manual.			
1.10.11 coleta freqüente do lixo.			
1.10.12 presença de avisos com os procedimentos para lavagem das mãos.			
1.10.13 vestiários com área compatível e armários individuais para todos os manipuladores.			
1.10.14 duchas ou chuveiros em número suficiente (conforme legislação específica), com água fria ou com água quente e fria.			
1.10.15 apresentam-se organizados e em adequado estado de conservação.			
1.11.1 instaladas totalmente independentes da área de produção e higienizados.			
1.12.1 existência de lavatórios na área de manipulação com água corrente, dotados preferencialmente de torneira com acionamento automático, em			

posições adequadas em relação ao fluxo de produção e serviço, e em número suficiente de modo a atender toda a área de produção.			
1.12.2 lavatórios em condições de higiene, dotados de sabonete líquido inodoro anti-séptico ou sabonete líquido inodoro e anti-séptico, toalhas de papel não reciclado ou outro sistema higiênico e seguro de secagem e coletor de papel acionados sem contato manual.			
b - avaliação	sim	não	na*
1.13 iluminação e instalação elétrica.			
1.13.1 natural ou artificial adequada à atividade desenvolvida, sem ofuscamento, reflexos fortes, sombras e contrastes excessivos.			
1.13.2 luminárias com proteção adequada contra quebras e em adequado estado de conservação.			
1.13.3 instalações elétricas embutidas ou quando exteriores revestidas por tubulações isolantes e presas a paredes e tetos.			
1.14.1 ventilação e circulação de ar capazes de garantir o conforto térmico e o ambiente livre de fungos, gases, fumaça, pós, partículas em suspensão e condensação de vapores sem causar danos à produção.			
1.14 ventilação e climatização			
1.14.2 ventilação artificial por meio de equipamento(s) higienizado(s) e com manutenção adequada ao tipo de equipamento.			
1.14.3 ambientes climatizados artificialmente com filtros adequados.			
1.14.4 existência de registro periódico dos procedimentos de limpeza e manutenção dos componentes do sistema de climatização (conforme legislação específica) afixado em local visível.			
1.14.5 sistema de exaustão e ou insuflamento com troca de ar capaz de prevenir contaminações.			
1.14.6 sistema de exaustão e ou insuflamento dotados de filtros adequados.			
1.14.7 captação e direção da corrente de ar não seguem a direção da área contaminada para área limpa.			
1.15.1 existência de um responsável pela operação de higienização comprovadamente capacitado.			



1.15 higienização das instalações.			
1.15.2 frequência de higienização das instalações adequada.			
1.15.3 existência de registro da higienização.			
1.15.4 produtos de higienização regularizados pelo ministério da saúde.			
1.15.5 disponibilidade dos produtos de higienização necessários à realização da operação.			
1.15.6 a diluição dos produtos de higienização, tempo de contato e modo de uso/aplicação obedecem às instruções recomendadas pelo fabricante.			
1.15.7 produtos de higienização identificados e guardados em local adequado.			
1.15.8 disponibilidade e adequação dos utensílios (escovas, esponjas etc.) necessários à realização da operação. em bom estado de conservação.			
1.15.9 higienização adequada.			
1.16 controle integrado de vetores e pragas urbanas			
1.16.1 ausência de vetores e pragas urbanas ou qualquer evidência de sua presença como fezes, ninhos e outros.			
1.16.2 adoção de medidas preventivas e corretivas com o objetivo de impedir a atração, o abrigo, o acesso e ou proliferação de vetores e pragas urbanas.			
1.16.3 em caso de adoção de controle químico, existência de comprovante de execução do serviço expedido por empresa especializada.			
1.17.1 sistema de abastecimento ligado à rede pública.			
1.17 abastecimento de água			
1.17.2 sistema de captação própria, protegido, revestido e distante de fonte de contaminação.			
1.17.3 reservatório de água acessível com instalação hidráulica com volume, pressão e temperatura adequados, dotado de tampas, em satisfatória condição de uso, livre de vazamentos, infiltrações e descascamentos.			
1.17.4 existência de responsável comprovadamente capacitado para a higienização do reservatório da água.			
1.17.5 apropriada frequência de higienização do reservatório de água.			
1.17.6 existência de registro da higienização do reservatório de água ou comprovante de execução de serviço em caso de terceirização.			

1.17.7 encanamento em estado satisfatório e ausência de infiltrações e interconexões, evitando conexão cruzada entre água potável e não potável.			
1.17.8 existência de planilha de registro da troca periódica do elemento filtrante.			
1.17.9 potabilidade da água atestada por meio de laudos laboratoriais, com adequada periodicidade, assinados por técnico responsável pela análise ou expedidos por empresa terceirizada.			
1.17.10 disponibilidade de reagentes e equipamentos necessários à análise da potabilidade de água realizadas no estabelecimento.			
1.17.11 controle de potabilidade realizado por técnico comprovadamente capacitado.			
1.17.12 gelo produzido com água potável, fabricado, manipulado e estocado sob condições sanitárias satisfatórias, quando destinado a entrar em contato com alimento ou superfície que entre em contato com alimento.			
1.17.13 vapor gerado a partir de água potável quando utilizado em contato com o alimento ou superfície que entre em contato com o alimento.			
b - avaliação	sim	não	na*
1.18 manejo dos resíduos			
1.18.1 recipientes para coleta de resíduos no interior do estabelecimento de fácil higienização e transporte, devidamente identificados e higienizados constantemente; uso de sacos de lixo apropriados. quando necessário, recipientes tampados com acionamento não manual.			
1.18.2 retirada freqüente dos resíduos da área de processamento, evitando focos de contaminação.			
1.18.3 existência de área adequada para estocagem dos resíduos.			
1.19 esgotamento sanitário			
1.19.1 fossas, esgoto conectado à rede pública, caixas de gordura em adequado estado de conservação e funcionamento.			
1.20 leiaute			
1.20.1 leiaute adequado ao processo produtivo: número, capacidade e distribuição das dependências de acordo com o ramo de atividade, volume de produção e expedição.			

1.20.2 áreas para recepção e depósito de matéria-prima, ingredientes e embalagens distintas das áreas de produção, armazenamento e expedição de produto final.			
observações			
b - avaliação	sim	não	na*
2. EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS			
2.1 equipamentos			
2.1.1 equipamentos da linha de produção com desenho e número adequado ao ramo.			
2.1.2 dispostos de forma a permitir fácil acesso e higienização adequada.			
2.1.3 superfícies em contato com alimentos lisas, íntegras, impermeáveis, resistentes à corrosão, de fácil higienização e de material não contaminante.			
2.1.4 em adequado estado de conservação e funcionamento.			
2.1.5 equipamentos de conservação dos alimentos (refrigeradores, congeladores, câmaras frigoríficas e outros), bem como os destinados ao processamento térmico, com medidor de temperatura localizado em local apropriado e em adequado funcionamento.			
2.1.6 existência de planilhas de registro da temperatura, conservadas durante período adequado.			
2.1.7 existência de registros que comprovem que os equipamentos e maquinários passam por manutenção preventiva.			
2.1.8 existência de registros que comprovem a calibração dos instrumentos e equipamentos de medição ou comprovante da execução do serviço quando a calibração for realizada por empresas terceirizadas.			
2.2 móveis: (mesas, bancadas, vitrines, estantes)			
2.2.1 em número suficiente, de material apropriado, resistentes, impermeáveis; em adequado estado de conservação, com superfícies íntegras.			
2.2.2 com desenho que permita uma fácil higienização (lisos, sem rugosidades e frestas).			
2.3 utensílios			
2.3.1 material não contaminante, resistentes à corrosão, de tamanho e forma			

que permitam fácil higienização: em adequado estado de conservação e em número suficiente e apropriado ao tipo de operação utilizada.			
2.3.2 armazenados em local apropriado, de forma organizada e protegidos contra a contaminação.			
2.4 higienização dos equipamentos e maquinários, e dos móveis e utensílios			
2.4.1 existência de um responsável pela operação de higienização comprovadamente capacitado.			
2.4.2 frequência de higienização adequada.			
2.4.3 existência de registro da higienização.			
2.4.4 produtos de higienização regularizados pelo ministério da saúde.			
2.4.5 disponibilidade dos produtos de higienização necessários à realização da operação.			
2.4.6 diluição dos produtos de higienização, tempo de contato e modo de uso/aplicação obedecem às instruções recomendadas pelo fabricante.			
2.4.7 produtos de higienização identificados e guardados em local adequado.			
2.4.8 disponibilidade e adequação dos utensílios necessários à realização da operação. em bom estado de conservação.			
2.4.9 adequada higienização.			
b - avaliação	sim	não	na*
3. MANIPULADORES			
3.1 vestuário			
3.1.1 utilização de uniforme de trabalho de cor clara, adequado à atividade e exclusivo para área de produção.			
3.1.2 limpos e em adequado estado de conservação.			
3.1.3 asseio pessoal: boa apresentação, asseio corporal, mãos limpas, unhas curtas, sem esmalte, sem adornos (anéis, pulseiras, brincos, etc.); manipuladores barbeados, com os cabelos protegidos.			
3.2 hábitos higiênicos			
3.2.1 lavagem cuidadosa das mãos antes da manipulação de alimentos, principalmente após qualquer interrupção e depois do uso de sanitários.			
3.2.2 manipuladores não espirram sobre os alimentos, não cospem, não			

tossem, não fumam, não manipulam dinheiro ou não praticam outros atos que possam contaminar o alimento.			
3.2.3 cartazes de orientação aos manipuladores sobre a correta lavagem das mãos e demais hábitos de higiene, afixados em locais apropriados.			
3.3 estado de saúde.			
3.3.1 ausência de afecções cutâneas, feridas e supurações; ausência de sintomas e infecções respiratórias, gastrointestinais e oculares.			
3.4 programa de controle de saúde.			
3.4.1 existência de supervisão periódica do estado de saúde dos manipuladores			
3.4.2 existência de registro dos exames realizados.			
3.5 equipamento de proteção individual.			
3.5.1 utilização de equipamento de proteção individual.			
3.6 programa de capacitação dos manipuladores e supervisão			
3.6.1 existência de programa de capacitação adequado e contínuo relacionado à higiene pessoal e à manipulação dos alimentos.			
3.6.2 existência de registros dessas capacitações.			
3.6.3 existência de supervisão da higiene pessoal e manipulação dos alimentos.			
3.6.4 existência de supervisor comprovadamente capacitado.			
Observações			
B - avaliação	Sim	Não	Na*
4. PRODUÇÃO E TRANSPORTE DO ALIMENTO			
4.1 matéria-prima, ingredientes e embalagens			
4.1.1 operações de recepção da matéria-prima, ingredientes e embalagens são realizadas em local protegido e isolado da área de processamento.			
4.1.2 matérias - primas, ingredientes e embalagens inspecionados na recepção.			
4.1.3 existência de planilhas de controle na recepção (temperatura e características sensoriais, condições de transporte e outros).			
4.1.4 matérias-primas e ingredientes aguardando liberação e aqueles aprovados estão devidamente identificados.			
4.1.5 matérias-primas, ingredientes e embalagens reprovados no controle			

efetuado na recepção são devolvidos imediatamente ou identificados e armazenados em local separado.			
4.1.6 rótulos da matéria-prima e ingredientes atendem à legislação.			
4.1.7 critérios estabelecidos para a seleção das matérias-primas são baseados na segurança do alimento.			
4.1.8 armazenamento em local adequado e organizado; sobre estrados distantes do piso, ou sobre paletes, bem conservados e limpos, ou sobre outro sistema aprovado, afastados das paredes e distantes do teto de forma que permita apropriada higienização, iluminação e circulação de ar.			
4.1.9 uso das matérias-primas, ingredientes e embalagens respeita a ordem de entrada dos mesmos, sendo observado o prazo de validade.			
4.1.10 acondicionamento adequado das embalagens a serem utilizadas.			
4.1.11 rede de frio adequada ao volume e aos diferentes tipos de matérias-primas e ingredientes.			
4.2 FLUXO DE PRODUÇÃO			
4.2.1 locais para pré - preparo ("área suja") isolados da área de preparo por barreira física ou técnica.			
4.2.2 controle da circulação e acesso do pessoal.			
4.2.3 conservação adequada de materiais destinados ao reprocessamento.			
4.2.4 ordenado, linear e sem cruzamento.			
b - avaliação	sim	não	na*
4.3 rotulagem e armazenamento do produto-final			
4.3.1 dizeres de rotulagem com identificação visível e de acordo com a legislação vigente.			
4.3.2 produto final acondicionado em embalagens adequadas e íntegras.			
4.3.3 alimentos armazenados separados por tipo ou grupo, sobre estrados distantes do piso, ou sobre paletes, bem conservados e limpos ou sobre outro sistema aprovado, afastados das paredes e distantes do teto de forma a permitir apropriada higienização, iluminação e circulação de ar.			
4.3.4 ausência de material estranho, estragado ou tóxico.			
4.3.5 armazenamento em local limpo e conservado.			

4.3.6 controle adequado e existência de planilha de registro de temperatura, para ambientes com controle térmico.			
4.3.7 rede de frio adequada ao volume e aos diferentes tipos de alimentos.			
4.3.8 produtos avariados, com prazo de validade vencido, devolvidos ou recolhidos do mercado devidamente identificados e armazenados em local separado e de forma organizada.			
4.3.9 produtos finais aguardando resultado analítico ou em quarentena e aqueles aprovados devidamente identificados.			
4.4 controle de qualidade do produto final:			
4.4.1 existência de controle de qualidade do produto final.			
4.4.2 existência de programa de amostragem para análise laboratorial do produto final.			
4.4.3 existência de laudo laboratorial atestando o controle de qualidade do produto final, assinado pelo técnico da empresa responsável pela análise ou expedido por empresa terceirizada.			
4.4.4 existência de equipamentos e materiais necessários para análise do produto final realizadas no estabelecimento.			
4.5 transporte do produto final			
4.5.1 produto transportado na temperatura especificada no rótulo.			
4.5.2 veículo limpo, com cobertura para proteção de carga. ausência de vetores e pragas urbanas ou qualquer evidência de sua presença como fezes, ninhos e outros.			
4.5.3 transporte mantém a integridade do produto.			
4.5.4 veículo não transporta outras cargas que comprometam a segurança do produto.			
4.5.5 presença de equipamento para controle de temperatura quando se transporta alimentos que necessitam de condições especiais de conservação.			
Observações			
b - avaliação	sim	não	na*
5. DOCUMENTAÇÃO			
5.1 manual de boas práticas de fabricação			

5.1.1 operações executadas no estabelecimento estão de acordo com o manual de boas práticas de fabricação.			
5.2 procedimentos operacionais padronizados:			
5.2.1 higienização das instalações, equipamentos e utensílios			
5.2.1.1 existência de pop estabelecido para este item.			
5.2.1.2 pop descrito está sendo cumprido.			
5.2.2 controle de potabilidade da água			
5.2.2.1 existência de pop estabelecido para controle de potabilidade da água.			
5.2.2.2 pop descrito está sendo cumprido			
5.2.3 higiene e saúde dos manipuladores			
5.2.3.1 existência de pop estabelecido para este item.			
5.2.3.2 pop descrito está sendo cumprido.			
5.2.4 manejo dos resíduos			
5.2.4.1 existência de pop estabelecido para este item.			
5.2.4.2 o pop descrito está sendo cumprido.			
5.2.5 manutenção preventiva e calibração de equipamentos.			
5.2.5.1 existência de pop estabelecido para este item.			
5.2.5.2 o pop descrito está sendo cumprido.			
5.2.6 controle integrado de vetores e pragas urbanas			
5.2.6.1 existência de pop estabelecido para este item.			
5.2.6.2 o pop descrito está sendo cumprido.			
5.2.7 seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens			
5.2.7.1 existência de pop estabelecido para este item.			
5.2.7.2 o pop descrito está sendo cumprido.			
b - avaliação	sim	não	na*
5.2.8 programa de recolhimento de alimentos.			
5.2.8.1 existência de pop estabelecido para este item.			
5.2.8.2 o pop descrito está sendo cumprido.			
C - CONSIDERAÇÕES FINAIS			
D - CLASSIFICAÇÃO DO ESTABELECIMENTO			



compete aos órgãos de vigilância sanitária estaduais e distrital, em articulação com o órgão competente no âmbito federal, a construção do panorama sanitário dos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos, mediante sistematização dos dados obtidos nesse item. o panorama sanitário será utilizado como critério para definição e priorização das estratégias institucionais de intervenção.

( ) grupo 1 - 76 a 100% de atendimento dos itens ( ) grupo 2 - 51 a 75% de atendimento dos itens  
( ) grupo 3 - 0 a 50% de atendimento dos itens

e - Responsáveis pela inspeção

\_\_\_\_\_  
NOME E ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
NOME E ASSINATURA DO RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO

LOCAL:

DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(\*) NA: NÃO SE APLICA