

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
FMVZ – UNESP – CAMPUS DE BOTUCATU - SP

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DE DIFERENTES TIPOS DE SALADAS
PROVENIENTES DE COZINHAS HOSPITALARES**

LETÍCIA BORGES NUNES CORREIA

BOTUCATU – SP
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
FMVZ – UNESP – CAMPUS DE BOTUCATU - SP

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DE DIFERENTES TIPOS DE SALADAS
PROVENIENTES DE COZINHAS HOSPITALARES**

LETÍCIA BORGES NUNES CORREIA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Dr. Germano Francisco Biondi

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Correia, Letícia Borges Nunes.

Perfil microbiológico de diferentes tipos de saladas
provenientes de cozinhas hospitalares / Letícia Borges
Nunes Correia. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Germano Francisco Biondi

Coorientador: Ricardo Seiti Yamatogi

Capes: 50701037

1. Diagnóstico microbiológico. 2. Saladas. 3. Hospitais
- Serviço de alimentação. 4. Estafilococos. 5. Coagulase.
6. Salmonella.

Palavras-chave: Coliformes; Estafilococos coagulase
positiva; Hospital; Saladas; Salmonella spp.

Nome do Autor: Letícia Borges Nunes Correia

Título: Perfil microbiológico de diferentes tipos de saladas provenientes de cozinhas hospitalares

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu
Orientador

Dr^a. Anee Valéria Mendonça Stachissini
Fiscal Federal Agropecuário – UTRA – Botucatu
Membro

Dr^a. Kate Aparecida Buzi
Universidade Estadual do Centro Oeste – Paraná
Membro

Data da Defesa: 17/04/2015

À minha mãe Andréa Paula Borges de Sousa e ao meu pai Paulo Ricardo Nunes por terem sido escolhidos e motivados no momento exato para que eu pudesse existir e pertencer a essa família que tanto amo.

Ao meu avô Severino Siqueira de Sousa por me encorajar em cada fase dessa conquista. À minha avó Cecília de Antoni pelo exemplo de força e superação.

Aos meus tios Cleber Trida, Aline Borges de Sousa Trida e Amazor Borges de Sousa e ao meu sogro Luiz e à minha sogra Josefa que de alguma forma sempre estiveram presentes.

Ao meu irmão Leandro Borges de Sousa Nunes e à minha cunhada Joyce Borges, verdadeiros anjos que intercedem por mim.

Ao meu amado Fernando de Oliveira Correia por me conceder a honra de ser a sua esposa e por todas as consequências dessa escolha, mas acima de tudo pelo homem que me conduz pelo vivo e novo caminho,

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, pois tudo vem Dele e tudo volta para Ele.

Ao meu orientador, Germano Francisco Biondi, que sempre acreditou em mim, enriquecendo à minha vida pessoal e profissional.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do campus de Botucatu pela oportunidade.

Aos colegas de pesquisa Fábio Sossai Possebon, Otávio Augusto Martins e Ricardo Seiti Yamatogi pelo apoio e disposição.

Ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja e José Paes de Almeida Nogueira Pinto pela gentileza ao me ouvirem e pelas palavras de sabedoria.

Ao Carlos Pazini Junior pela paciência e presteza.

Aos funcionários do Serviço de orientação à Alimentação Pública (SOAP) e todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução desse trabalho deixo a minha imensa gratidão.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados epidemiológicos dos surtos de DTA ocorridos no Brasil no período de 2010 a 2014.....	9
TABELA 2 - Porcentagem de amostras SPT e CPT e porcentagem total das saladas analisadas no SOAP no período de 2010 a 2014.....	14
TABELA 3 - Número e porcentagem de amostras acima do limite de 10^2 NMP/g de coliformes a 45°C estabelecido pela Resolução n.º 12/01 dividido por categoria.....	16

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Log do NMP de coliformes a 35°C das amostras distribuídas em categorias. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).....15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHI	Brain Heart Infusion
BP	Ágar Baird Parker
BPA's	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BP's	Boas Práticas
BS	Ágar Bismuto Sulfito
CBT	Contagem Bacteriana Total
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPT	Com Processamento Térmico
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EC	<i>Escherischia coli</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IN	Instrução Normativa
LIA	Lisina Iron Agar
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
NMP	Número Mais Provável
PPC	Produto Pronto para o Consumo
RV	Rappaport Vassiliadis
SAN	Segurança Alimentar e Nutricional
SOAP	Serviço de Orientação à Alimentação Pública
SPT	Sem Processamento Térmico
TSI	Triple Sugar Iron
TT	Tetrationato
UAN	Unidade de Alimentação e Nutrição
VBB	Verde Brilhante Bile
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

Página

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Consumo de hortaliças.....	3
2.2. Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN)	4
2.3. Boas Práticas (BPs)	5
2.4. Segurança Alimentar e Nutricional (SAN)	6
2.5. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)	7
3. OBJETIVO	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Pesagem e diluição das amostras	10
4.2. Determinação do número mais provável de coliformes a 35°C e 45°C...10	
4.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	11
4.4. Contagem de estafilococos coagulase positiva	12
4.5. Coleta de dados	13
4.6. Análise estatística	13
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSSÃO	16
7. CONCLUSÃO	21
8. BIBLIOGRAFIA	21
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	33
Anexos	49

CORREIA. L. B. N. **Perfil microbiológico de diferentes tipos de saladas provenientes de cozinhas hospitalares.** Botucatu, 2015. 69p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

As hortaliças são itens indispensáveis na dieta dos seres humanos, atuando como adjuvantes na prevenção e tratamento de doenças. Porém, destaca-se o aumento de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) associados ao consumo de produtos hortícolas. O objetivo desse trabalho foi verificar o perfil microbiológico de diferentes tipos de saladas de cozinhas hospitalares. No período de 2010 a 2014, o Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) recebeu 641 amostras de saladas provenientes de hospitais da região de Bauru e Botucatu, onde foram submetidas às análises microbiológicas para a determinação do número mais provável de coliformes a 35°C e 45°C, pesquisa de *Salmonella* spp e contagem de estafilococos coagulase positiva. Os resultados revelaram que em 30,56% das amostras a contagem de coliformes a 35°C foi maior que 1.100 NMP/g e 12,17% apresentaram coliformes a 45°C acima de 100 NMP/g, limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. A prevalência de amostras contaminadas sem tratamento térmico foi de 97,44% e de 2,56% para amostras com tratamento térmico, cozidas ou refogadas. Todas as amostras foram negativas para presença de *Salmonella* spp e apresentaram contagem de estafilococos coagulase positiva $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g. Apesar das amostras de saladas não oferecerem risco microbiológico associado à patógenos, deve-se atentar para os micro-organismos indicadores, pois as refeições são servidas a indivíduos hospitalizados.

Palavras-chave: Coliformes, Estafilococos coagulase positiva, Hospital, Saladas, *Salmonella* spp.

CORREIA. L. B. N. **Microbiological profile of different types of salad from hospital kitchens**. Botucatu, 2015. 69p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

Vegetables crops are indispensable items in human diet, acting as adjuvants in the prevention and treatment of diseases. However, the number of Foodborne Diseases outbreaks associated with their consumption increases. The aim of this study was determine the microbiological profile of different salads from hospital kitchens. In the period between 2010 and 2014 the *Public feeding orientation service* (SOAP) received 641 samples of salads from hospital kitchens in the region of Botucatu and Bauru. They, where subjected to microbiological analysis to determine the most probable number of coliforms at 35 ° C and 45 ° C, besides *Salmonella* spp presence and coagulase-positive staphylococci counts. The results reveal that 30.56% of the samples had counts for coliform at 35°C greater than 1.100 MPN/g and 12.17% had MPN/g of coliforms at 45°C above 100 MPN/g, the maximum limit established by Brazilian legislation. The prevalence of samples without heat treatment was 2.56% and 97.44% with heat treatment, cooked or braised. All samples were negative for *Salmonella* spp count and coagulase positive staphylococci < 1,0x10² UFC/g. Although most salads had an adequate microbiological quality, attention should be paid to the safety indicators as the meals are served to hospitalized individuals.

Keywords: Coliforms, *Estafilococos* coagulase positiva, Hospital, Salads, *Salmonella* spp.

1. Introdução

A alimentação é um ato indispensável e direito de todos, podendo ser influenciada por aspectos culturais, sociais, étnicos, filosóficos, religiosos e regionais. Também contribui para a socialização e, sobretudo, deve satisfazer as necessidades nutricionais (FRANÇA et al., 2012).

O hábito alimentar dos brasileiros foi estabelecido pela miscigenação das culturas indígena, européia, africana e asiática. No período colonial, os portugueses trouxeram a produção e o consumo de hortaliças, que foram intensificados com a imigração de outros povos (MADEIRA et al., 2008; FRANÇA et al., 2012).

A alimentação possui um importante papel na promoção da saúde. Os vegetais são fontes de vitaminas e fibras, sendo essenciais na dieta dos seres humanos (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; RAMOS et al., 2013).

O consumo regular de algumas hortaliças pode prevenir diversos tipos de câncer (FREEDMAN et al., 2014; OYEBODE et al., 2014; WANG et al., 2014), além de estar associado à diminuição da ocorrência de doenças cardiovasculares (OYEBODE et al., 2014; WANG et al., 2014) e redução do peso, prevenindo a obesidade (SLAVIN; LIOID, 2012; BERTOIA et al., 2014).

Para garantir que os benefícios proporcionados pelo consumo das hortaliças sejam mantidos é essencial que essas e os pratos preparados a partir delas sejam seguros. Nas Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) hospitalares essa questão deve ser prioridade, pois as refeições são destinadas a indivíduos hospitalizados (GONÇALVES et al., 2013; STANGARLIN et al., 2013).

A nutrição dentro de uma unidade hospitalar deve fazer parte da terapia como um serviço de apoio ao tratamento (DE SETA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013). Os atributos de compra, recebimento, armazenamento, processamento e distribuição de refeições aos diversos tipos de pacientes são de responsabilidade da UAN (WENDISCH, 2010).

A deficiência de um treinamento efetivo de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para indivíduos que exercem funções laborais dentro das UAN hospitalares pode gerar agravos aos pacientes, contribuindo para a ocorrência de infecção hospitalar (RODRIGUEZ et al., 2011; STANGARLIN et al., 2013).

A contaminação de um alimento pode ocorrer em qualquer fase da produção, podendo ter origem na fase primária como resultado da contaminação de equipamentos e do ambiente (solo, água e ar), durante a pré-colheita e pela presença de animais (TABAN; HALKMAN, 2011; CEUPPENS et al., 2014; HOLVOET et al., 2014).

No preparo das refeições, os manipuladores de alimentos, os utensílios e as superfícies de contato são importantes fontes de contaminação, podendo veicular perigos de origem biológica, química ou física para o produto pronto para o consumo (PPC) (BALZARETTI; MARZANO, 2013; BRANDÃO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014).

A maioria Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são causadas por agentes biológicos que podem gerar quadros de infecções, intoxicações e toxinfecções (BRASIL, 2014; HAAS et al., 2014; MINNESOTA, 2014). Ocorrem ainda envenenamentos causados por toxinas naturais (cogumelos venenosos, toxinas de algas e peixes) ou por produtos químicos prejudiciais que podem contaminar o alimento (metais pesados, agrotóxicos e outros) (BRASIL, 2010; CDC, 2012).

Diversas refeições que são elaboradas a partir das hortaliças, como as saladas, apresentam um risco potencial de contaminação, pois na maioria das vezes esses alimentos são consumidos crus, não existindo nenhum processo térmico que reduza os perigos (HANEKOM et al., 2010; ARAÚJO, 2011).

Para garantir a inocuidade das hortaliças, bem como dos pratos preparados a partir desses ingredientes, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução n.º 12/01, estabelece padrões microbiológicos para alguns contaminantes como a ausência de *Salmonella* spp em 25 g do produto, 10^2 NMP/g de coliformes a 45° C e contagem de estafilococos coagulase positiva $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g (BRASIL, 2001).

2. Revisão de literatura

2.1. Consumo de hortaliças

Hortaliça é a planta herbácea da qual uma ou mais partes são utilizadas como alimento na sua forma natural (BRASIL, 1978). Pode ser classificada de acordo com a parte comestível em tuberosas (raízes, bulbos e tubérculos), frutos (legumes e sementes) e verduras (folhas, talos e flores) (BEVILACQUA, 2014; FAO, 2014).

As hortaliças compõem inúmeros pratos culinários, dentre eles as saladas. Salada é um termo derivado do latim, *sal*, que originou a variação *salata*, que significa coisas salgadas. As saladas são compostas por diversos alimentos, podendo conter apenas hortaliças ou a associação dessas com outros ingredientes (LYNNE OLVER, 2000).

O consumo de hortaliças no Brasil data do início do século XVII, quando essas passaram a ser adicionadas na dieta como um complemento eventual. Com a chegada ao Brasil do Príncipe Regente Dom João, em 1808, houve uma ascensão no consumo de saladas pelos indivíduos que tinham acesso à Corte Imperial, mas foi com a imigração dos japoneses que esses vegetais se tornaram mais populares (BEVILACQUA, 2014; FRANÇA et al., 2012). Apesar disso os brasileiros não se destacam como consumidores de hortaliças (SILVEIRA et al., 2011; REETZ et al., 2014).

De acordo com a recomendação da *World Health Organization* (WHO) uma pessoa deve ingerir no mínimo 400 g de frutas e hortaliças por dia, exceto batata e outros tubérculos ricos em amido (WHO, 2003). Diversos fatores influenciaram no consumo das hortaliças, como a idade mais avançada, maior poder aquisitivo, o fato de conviver com companheiro e maior nível de escolaridade (MONDINI et al., 2010; CONNECTION, 2011; RAMALHO et al., 2012).

A presença das hortaliças na dieta ajuda a prevenir diversas doenças crônicas não transmissíveis, como o Acidente Vascular Cerebral (AVC), *diabetes mellitus* tipo 2, catarata, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer e obesidade (BOEING, et al., 2012; OYEBODE et al., 2014; WANG et al., 2014).

Estudos mostram a relação entre o consumo de frutas e hortaliças e a prevenção e diminuição dos riscos que podem causar doenças cardíacas (HARTLEY et al., 2013; LEENDERS, et al., 2013; WANG et al., 2014).

Uma dieta rica em frutas e legumes, associada à atividade física, são opções baratas para diminuir os riscos de câncer de mama (KRUK, 2014). Segundo Kim (2011), a ingestão adequada de frutas, vegetais e vitamina C, oferece benefícios à gestante, prevenindo complicações que podem prejudicar a gravidez e a saúde da criança.

No mundo estima-se que 2,8% das mortes foram atribuídas ao baixo consumo de frutas e vegetais, e a baixa ingestão é a causa de aproximadamente 14% das mortes por câncer gastrointestinal, 11% das doenças isquêmicas do coração e cerca de 9% do AVC (WHO, 2003).

Os distúrbios nutricionais mais comuns e debilitantes, tais como, deficiências congênitas, retardo mental e físico, imunossupressão e a cegueira, são causados por dietas pobres em vitaminas e minerais, sendo que o consumo reduzido de frutas e vegetais constitui um importante fator na ocorrência dessas enfermidades (WHO, 2003).

2.2. Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN)

As exigências da sociedade moderna têm refletido no estilo de vida das pessoas e com o tempo escasso os indivíduos têm buscado soluções práticas para as tarefas do cotidiano, inclusive no que diz respeito à alimentação. Para muitos a refeição fora de casa em UAN se torna uma opção viável (DIEZ-GARCIA et al., 2012; CUNHA et al., 2013).

As UAN são unidades gerenciais do serviço de nutrição responsáveis por desenvolver todas as atividades técnicas e administrativas para a produção de alimentos e refeições, oferecendo alimentos seguros do ponto de vista microbiano e físico-químico, e que apresentem qualidade nutricional para indivíduos sadios e enfermos (BRASIL, 2002; BRASIL, 2005; WENDISCH, 2010).

Dentre as unidades de trabalho ou órgãos de uma empresa que se enquadram como UAN estão, os hospitais, as universidades, os restaurantes industriais e comerciais, as lanchonetes, pizzarias, empresas aéreas e creches (PINTO et al., 2013). As UAN hospitalares são estabelecimentos que possuem

infra-estrutura pessoal e operacional para o preparo de refeições, assegurando a saúde dos indivíduos através da garantia da qualidade dos alimentos (MAIA, et al., 2011; STANGARLIN, 2013).

A prestação de cuidados nutricionais de qualidade ainda é um desafio nas UAN hospitalares onde o abastecimento de alimentos está entre as inúmeras atividades inerentes aos hospitais. O serviço de nutrição deve garantir que as refeições oferecidas aos pacientes correspondam às suas necessidades, contribuindo para a sua recuperação (KELLER, et al., 2014).

A produção de alimentos saudáveis deve ser realizada dentro dos padrões higiênicos adequados com o objetivo de evitar surtos de DTAs. Diante dessa premissa, a higiene pessoal dos manipuladores é de suma importância para a elaboração de alimentos seguros e de qualidade (COSTA et al., 2013; IUNG, et al., 2013).

2.3. Boas Práticas (BPs)

De acordo com a Resolução n.º 216/04 da ANVISA, as BPs são procedimentos que devem garantir a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e a sua conformidade com a legislação sanitária (BRASIL, 2004).

Os princípios de BPs devem ser rigorosos em qualquer serviço de alimentação, principalmente nas unidades hospitalares onde as refeições são destinadas a pessoas, na maioria das vezes, debilitadas, devendo-se evitar qualquer tipo de contaminação que possa causar complicações ao paciente (FARIAS et al., 2011; STANGARLIN et al., 2013).

As ferramentas de BPF e as Análises de Perigos e Ponto Crítico de Controle (APPCC) devem ser aplicadas nas UAN hospitalares, de modo a evitar contaminações e a proliferação de micro-organismos (RODRIGUEZ, et al., 2011; VIECELLE, et al., 2013).

A execução de BPs deve ocorrer desde a produção primária através da aplicação de Boas Práticas Agrícolas (BPAs). As BPAs compreendem quatro pilares: viabilidade econômica, sustentabilidade ambiental e social, aceitabilidade e segurança alimentar (FAO, 2008; UNIVERSITY OF KENTUCKY, 2012).

As principais fontes de contaminação durante a produção de hortaliças são as fezes de humanos e animais, a água de irrigação, a utilização de esterco

bruto, o solo contaminado, o maquinário, a ferramenta, os utensílios e o trabalhador (CEUPPENS et al., 2014; HOLVOET et al., 2014).

Ainda existem inúmeras dificuldades para se controlar os riscos de contaminação na produção primária, devendo os processos de pré-colheita e pós-colheita serem monitorados através da adoção de BPAs (SENHOR et al., 2009; CEUPPENS et al., 2014).

2.4. Segurança Alimentar e Nutricional (SAN)

A SAN consiste no acesso regular e permanente a alimentos de qualidade e em quantidade adequada (BRASIL, 2006).

No Brasil a preocupação dos governantes com a alimentação se transformou em políticas públicas a partir do século XX, englobando diversos aspectos que foram sendo aprimorados ao longo dos anos. Desta forma, o conceito SAN deve estabelecer a integração inter-setorial, envolvendo políticas e ações de todos os níveis do governo (SEGALL-CORRÊA; MARIN-LEON, 2009; PRADO et al., 2010; BURLANDY et al., 2012).

A Cúpula Mundial da Alimentação de 1996, diz que a SAN é efetiva quando: "Todas as pessoas em todos os momentos têm acesso a alimentos suficientes, seguros e nutritivos para manter uma vida saudável e ativa." (FAO, 2008; WHO, 2014).

A SAN deve abordar assuntos relacionados à higiene, comercialização e manipulação de alimentos, considerando a fome e a obesidade fatores que contribuem para a insegurança alimentar (BEZERRA, et al., 2014). A produção de alimentos frente ao conceito de SAN, depende de medidas de redução do desperdício, mudança no hábito alimentar, maior produtividade e otimização do rendimento produtivo (GODFRAY, et al., 2010).

A promoção da SAN depende da percepção do consumidor frente a esse conceito. Compreender aspectos como acessibilidade econômica, qualidade e sustentabilidade faz com que a população se conscientize em relação aos seus direitos na escolha dos alimentos exigindo que os conceitos de SAN sejam cumpridos (KNEAFSEY et al., 2013).

2.5. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

A existência de saúde envolve o pleno bem estar físico, mental e social (WHO, 1948). As DTAs estão entre as inúmeras causas que podem comprometer a saúde do indivíduo e da população. Existem mais de 250 doenças causadas pela ingestão de alimentos e água contaminados e a maioria dos surtos são causados por infecções, intoxicações e toxinfecções de origem biológica (BRASIL, 2010; CDC, 2012).

Um surto é caracterizado quando um grupo de pessoas consome o mesmo alimento e água e dois ou mais indivíduos apresentam os mesmos sinais e sintomas, ou quando ocorre uma doença rara (CDC, 2013; BRASIL, 2014). Nos EUA ocorrem cerca de 800 mil surtos de DTAs por ano e a manipulação inadequada dos alimentos é um dos principais fatores que contribuem para esses índices (BENNETT et al., 2014; DA CUNHA et al., 2014).

Dados mostram que a *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são importantes agentes causadores de DTAs no Brasil (Tabela 1), nos EUA e na Europa (CDC, 2012; BENNETT et al, 2014; BRASIL, 2014; WHO, 2014).

Estimativas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) revelam que 48 milhões de americanos ficam doentes a cada ano em decorrência de DTAs, 128 mil são hospitalizados e 3.000 vão a óbito. No período de 2010 a 2014, no Brasil, ocorreram 114 surtos de DTAs em unidades hospitalares enquanto que nos EUA foram notificados 108 surtos no período de 1998 a 2012 (BRASIL, 2014; CDC, 2014).

De acordo com a Agência de Proteção à Saúde da Inglaterra, foram notificados 2.332 surtos de DTAs no período de 1992 a 2011. Os locais de maior ocorrência foram os serviços de alimentação, residências e o varejo. Quanto aos fatores que contribuíram para os surtos os principais foram à contaminação cruzada, o tempo prolongado de armazenamento e os manipuladores de alimentos (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2014).

Os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos de DTAs são as carnes, frutas e as hortaliças. Os produtos mistos também representam um risco potencial, onde um ingrediente pode vir a contaminar todo o alimento (TABAN; HALKMAN, 2011; CDC, 2012; BENNETT et al., 2014).

A ocorrência de DTAs causadas pela ingestão de frutas e vegetais crus têm aumentado significativamente e os principais agentes associados aos surtos são a *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e a *Listeria monocytogenes* (TABAN; HALKMAN, 2011; CDC, 2013).

Kozak et al. (2013) verificou os surtos associados a vegetais frescos e frutas no Canadá no período de 2001 a 2009, onde 27 itens de origem vegetal estiveram associados com a ocorrência de aproximadamente 1.549 surtos de DTAs. Entre as bactérias mais frequentes estavam a *Salmonella* spp (50%), *Escherichia coli* (33%) e *Shigella* spp (17%).

O conhecimento das características associadas às hortaliças, aos micro-organismos, ao ambiente e ao processamento, ajuda a elucidar as possíveis causas no aumento dos surtos em decorrência do consumo de vegetais crus (BERGER et al., 2010; KOZAK et al., 2013).

Os indivíduos acometidos por DTAs causadas por bactérias do gênero *Salmonella* spp, geralmente, apresentam quadros de febre, náuseas, cólicas abdominais, diarreia e vômito no período de 12 a 72 h após a ingestão do alimento contaminado com duração média de 4 a 7 dias, podendo evoluir para formas graves levando a septicemia, osteomielite e morte (CDC, 2012; THRELFALL et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Outros agentes bacterianos, como os *Staphylococcus aureus*, são caracterizados por levarem a quadros de intoxicação pela ingestão da toxina formada em consequência da intensa proliferação do micro-organismo no alimento. Nessa condição, os sintomas ocorrem em um período que pode variar de 30 minutos a 6 h após a ingestão do alimento, causando náusea, vômito, dores de estômago e diarreia, com duração de um dia, podendo se agravar em algumas situações (CDC, 2010; BRASIL, 2010).

Apesar da maioria das bactérias do grupo coliformes serem inofensivas, habitando normalmente o intestino de animais e do homem, algumas cepas são patogênicas e podem causar quadros de diarreia e doenças não entéricas (CDC, 2014).

De forma geral não existe uma síndrome específica associada às DTAs, porém como a porta de entrada se dá pela via oral, as primeiras manifestações clínicas estão associadas ao trato gastrointestinal, mas também podem ocorrer

manifestações extra-intestinais, acometendo diversos órgãos e sistemas BRASIL, 2010; CDC, 2012).

Considerando as características atribuídas ao alimento em estudo, como a presença das hortaliças na composição de pratos que fazem parte do hábito alimentar dos brasileiros, principalmente em dietas hospitalares, assim como sua relevância na promoção da saúde, tanto como adjuvante no tratamento de algumas doenças quanto na causa de surtos de doenças transmitidas por alimentos, são necessárias pesquisas que gerem informações a respeito do perfil microbiológico de refeições servidas em UAN hospitalares.

TABELA 1. Dados epidemiológicos dos surtos de DTA ocorridos no Brasil no período de 2010 a 2014.

Ano	2010	2011	2012	2013	2014	Total
Nº. de surtos	498	795	863	800	209	3165
Nº. de casos de DTA	8.626	17.884	14.670	16.720	2.950	60.850
Local de ocorrência						
Hospitais e unidades de saúde	26	30	25	18	15	114
Agentes etiológicos						
<i>Escherichia coli</i>	28	50	57	42	14	191
<i>Staphylococcus aureus</i>	41	38	46	24	1	150
<i>Salmonella spp</i>	35	28	34	27	4	128
Produtos envolvidos						
Hortaliças	2	11	9	5	0	27
Alimentos mistos	79	81	60	39	6	265
Água	26	35	49	47	20	177

Fonte: Adaptado de Sinan/Net/SVS/MS (BRASIL, 2014).

3. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi verificar o perfil microbiológico de diferentes tipos de saladas provenientes de cozinhas hospitalares das regiões de Bauru e Botucatu, por meio das seguintes análises:

- Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes a 35°C e 45°C;
- Pesquisa de *Salmonella* spp;
- Contagem de estafilococos coagulase negativa.

4. Material e Métodos

No período de janeiro de 2010 a julho de 2014, o Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) *Campus* de Botucatu recebeu 641 amostras de saladas provenientes de hospitais da região de Botucatu e Bauru. As amostras foram encaminhadas em caixa isotérmica e direcionadas ao laboratório de microbiologia para a realização das seguintes análises: determinação no número mais provável de coliformes a 35°C e a 45°C, pesquisa de *Salmonella* spp e contagem de estafilococos coagulase positiva.

4.1. Pesagem e diluição das amostras

A pesagem das amostras foi realizada em balança analítica (Gehaka BK 3000) dentro da capela de fluxo laminar (Veco Bio Seg 12). Logo após a limpeza das embalagens com álcool 70% foram pesados assepticamente 25 g das amostras homogeneizadas e adicionados 225 mL de água peptonada tampoadada 0,1%, seguido de homogeneização realizada em *Stomacher*. Foi transferido 1 mL desta diluição 10^{-1} para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução salina 0,9%, obtendo a diluição 10^{-2} e repetido mais uma vez para diluição 10^{-3} .

4.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes a 35°C e 45°C

As análises foram realizadas de acordo com as metodologias preconizadas pela Instrução Normativa (IN) n.º 62/03 (BRASIL, 2003).

A. Prova Presuntiva

Após a obtenção das diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foi inoculado 1 mL de cada diluição em cada tubo contendo 1 tubo de Durham e 9 mL de caldo Lauril Sulfato de Sódio (LSS) Oxoid. A diluição 10^{-1} foi inoculada em cada tubo na primeira série de 3 tubos, a 10^{-2} na segunda série e a 10^{-3} na terceira. As amostras foram incubadas em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 24 a 48 h.

B. Prova Confirmativa

Cada tubo positivo de LSS (produção de gás no tubo de Durham) obtido na prova presuntiva foi repicado com o auxílio da alça de platina, para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile (VBB) Oxoid para a confirmação de coliformes a 35°C e caldo *Escherichia coli* (EC) Oxoid para a confirmação de coliformes a 45°C , ambos com tubos de Durham, os quais foram incubados, respectivamente, em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e banho-maria a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 h.

C. Leitura

A positividade de coliformes a 35°C e a 45°C se deu pela produção de gás dentro do tubo de Durham. O número de tubos positivos em cada diluição foi confrontado na tabela estatística padrão para determinação do NMP.

4.3. Pesquisa de *Salmonella* spp

A pesquisa de *Salmonella* spp foi realizada segundo a metodologia preconizada por Andrews et al. (2011), conforme etapas descritas a seguir:

A. Pré-enriquecimento

A alíquota de 25 g de amostra previamente pesada e adicionada de 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% foi incubada em estufa bacteriológica por 24 ± 02 h a 35°C .

B. Enriquecimento Seletivo

Da mistura pré-enriquecida, foi transferido com o auxílio de uma pipeta estéril 0,1 mL e 1 mL para tubos contendo 10 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) Oxoid e 10 mL de caldo Tetrationato (TT) Oxoid, respectivamente. Os caldos RV e TT foram incubados por 18 ± 02 h a $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em banho-maria.

C. Plaqueamento Seletivo

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, foram realizadas estrias em placas com Ágar Bismuto Sulfito (BS) Oxoid e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

(XLD) Oxoid, sendo as mesmas incubadas a seguir em estufa bacteriológica por 24 ± 02 h a 35°C .

D. Identificação bioquímica

As colônias características de *Salmonella* spp foram repicadas para tubos contendo TSI (Triple Sugar Iron) e LIA (Lisina Iron Agar) que foram incubados a 35°C por 18 a 24 h. Foram ainda realizados os seguintes testes bioquímicos: produção de indol, reação de Vermelho de Metila e de Voges-Proskauer, Citrato de Simmons, produção de urease, utilização de glicose e lactose, observação do movimento e produção de fenilalanina desaminase.

E. Soroaglutinação

Foi realizada empregando-se anti-soro somático polivalente (Antígeno O).

4.4. Contagem de estafilococos coagulase positiva.

As análises foram realizadas de acordo com as metodologias preconizadas pela Instrução Normativa (IN) n.º 62/03 (BRASIL, 2003).

A. Diluição e plaqueamento seletivo

Após a pesagem e diluição das amostras foi semeado 0,1 mL da diluição 10^{-1} em placas contendo Ágar Baird-Parker (BP) Oxoid. Com o auxílio da alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio de cultura, até a sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas em estufa a uma temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 a 48 h.

B. Leitura

As placas que continham entre 20 a 200 colônias foram selecionadas para leitura. As colônias típicas (T) e atípicas (A) foram contadas e registradas separadamente. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias de cada tipo (T) e (A) e cada colônia foi semeada em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 h.

C. Prova da coagulase

Foram transferidos 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho e incubados a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 6 h, após esse período foi verificada a presença de coágulos.

4.5. *Coleta de dados*

A coleta dos resultados foi realizada através da verificação dos laudos gerados pelo Programa de Gerenciamento das Amostras para Análise (PGAA). As informações foram coletadas em planilha do Excel 2010 para posterior análise estatística.

4.6. *Análise estatística*

A distribuição dos valores de NMP para Coliformes a 35°C foi verificada através dos gráficos quantil-quantil e Box plot, verificando-se ausência de normalidade. A análise estatística procedeu-se utilizando o teste não paramétrico para amostras independentes de Wilcoxon através do PROC NPAR1WAY (SAS, 2011), visto que a transformação em escala logarítmica não foi efetiva para a normalização. No entanto, os resultados foram expressos graficamente em escala logarítmica para melhor visualização.

Um modelo de regressão logística foi utilizado através do PROC GLIMMIX (SAS, 2011) para estimar as chances de encontrar amostras consideradas positivas para coliformes a 45°C como função das variáveis explanatórias: processamento térmico e a categoria da hortaliça. O termo de interação entre processamento térmico e a categoria da hortaliça foi testado no modelo. Os resultados foram apresentados em porcentagem. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

No período de janeiro de 2010 a julho de 2014, foram analisadas 641 amostras de saladas provenientes de cozinhas hospitalares localizadas na região de Bauru e Botucatu. Dessas, 607 (94,70%) não foram submetidas a nenhum tipo de processamento térmico (SPT) e 34 (5,30%) passaram por processamento térmico, cozidas ou refogadas (CPT).

De acordo com a parte da hortaliça destinada ao consumo, as amostras foram categorizadas em folhas, frutos e tuberosas. Um 4º grupo, denominado mistas, foi criado para categorizar as amostras compostas por mais de um ingrediente (Tabela 2).

TABELA 2. Porcentagem de amostras SPT e CPT e porcentagem total das saladas analisadas no SOAP no período de 2010 a 2014

Amostras	SPT (%)	CPT (%)	Total (%)
Frutos	26 (89,65)	3 (10,34)	29 (4,52)
Abóbora	1 (50)	1 (50)	2 (0,31)
Abobrinha	1 (100)	0 (0)	1 (0,16)
Berinjela	6 (0,75)	2 (25)	8 (1,25)
Tomate	14 (100)	0 (0)	14 (2,18)
Pepino	4 (100)	0 (0)	4 (0,62)
Folhas	521 (98,67)	7 (1,32)	528 (82,37)
Acelga	34 (97,14)	1 (2,86)	35 (5,46)
Agrião	48 (100)	0 (0)	48 (7,49)
Alface	155 (100)	0 (0)	155 (24,18)
Almeirão	87 (100)	0 (0)	87 (13,57)
Cebolinha	2 (100)	0 (0)	2 (0,31)
Cheiro verde	9 (100)	0 (0)	9 (1,40)
Chicória	9 (100)	0 (0)	9 (1,40)
Couve manteiga	25 (83,33)	5 (16,67)	30 (4,68)
Escarola	42 (100)	0 (0)	42 (6,55)
Espinafre	2 (100)	0 (0)	2 (0,31)
Repolho	37 (97,37)	1 (2,63)	38 (5,93)
Rúcula	69 (100)	0 (0)	69 (10,76)
Salsinha	2 (100)	0 (0)	2 (0,31)
Tuberosas	26 (76,47)	8 (23,52)	34 (5,30)
Batata	0 (0)	2 (100)	2 (0,31)
Beterraba	11 (100)	0 (0)	11 (1,72)
Cebola	1 (100)	0 (0)	1 (0,16)
Cenoura	14 (70)	6 (30)	20 (3,12)
Mista	34 (68)	16 (32)	50 (7,8)
Total	607 (94,70)	34 (5,30)	641 (100)

SPT: Sem Processamento Térmico e CPT: Com Processamento Térmico

Todas as amostras 641 (100%) apresentaram ausência de *Salmonella* spp em 25 g e contagem de estafilococos coagulase positiva $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g.

Do total de amostras, 196 (30,60%) apresentaram presença de coliformes a 35°C maior que 1.100 NMP/g. A mediana (min-max) foi de 93 (0,3-24.000) para amostras SPT e 10 (3-2.400) para as amostras CPT ($p=0,01$).

A Figura 1 mostra o NMP de coliformes a 35°C nas saladas de acordo com a categoria. Das 4 categorias analisadas, apenas as folhas apresentaram diferença estatística em relação as mistas e tuberosas ($p<0,05$).

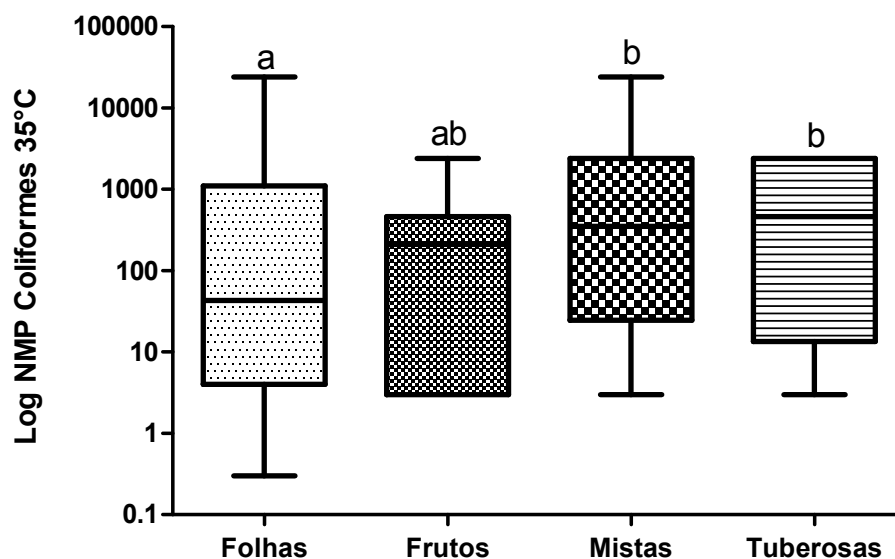


FIGURA 1. Log do NMP de coliformes a 35°C das amostras distribuídas em categorias. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$)

A porcentagem total de amostras positivas para coliforme a 45°C acima de 100 NMP/g, limite padrão estabelecido pela legislação foi de 78 (12,17%) onde 76 (97,44%) eram amostras SPT e 2 (2,56%) amostras CPT. As chances das amostras SPT serem positivas foram 6,98 maiores quando comparadas com as amostras do grupo CPT, com intervalo de confiança de 95% (IC): (1,48-32,65) apresentando diferença estatística ($p<0,05$).

Na Tabela 3 as hortaliças tuberosas foram as que apresentaram maior porcentagem de positividade para a presença de coliformes a 45°C acima dos limites estabelecidos pela legislação, 15 (44,12%), apresentando diferença estatística em relação às outras categorias ($p<0,05$). As tuberosas tiveram 10,53 (4,73-23,55) mais chances de serem positivas do que as folhas, 8,93 (2,17-

37,03) em relação aos frutos e 3,55 (1,31-10,00) quando comparadas com as mistas.

Também houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre mistas e folhas, onde as mistas tiveram 2,98 (1,32-6,71) mais chances de serem positivas do que as folhas. Não houve diferença estatística entre frutos e folhas e entre mistas e frutos ($p > 0,05$).

TABELA 3. Número e porcentagem de amostras acima do limite de 10^2 NMP/g de coliformes a 45°C estabelecido pela Resolução n.º 12/01 dividido por categoria

Material	N Total	N Pos	% Pos[*]
Tuberosas	34	15	44,12%^a
Mistas	50	9	18,00%^b
Frutos	29	3	10,34%^{bc}
Folhas	528	51	9,66%^c
Total	641	78	12,17%

N Total: Número total de amostras da categoria, N Pos: Número de amostras positivas na categoria, % Pos: Porcentagem de amostras positivas na categoria.

* Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

6. Discussão

Apesar de não existir padrão na legislação brasileira para o NMP de coliformes a 35°C , o número elevado desses micro-organismos em produtos prontos para o consumo (PPC) fornece informações sobre as práticas de higiene adotadas antes, durante e após o seu processamento, assim como as condições microbiológicas do produto fresco (JAY, 2005; OLAIMAT; HOLLEY, 2012).

Corroborando com os resultados encontrados, diversos autores relatam a ocorrência de coliformes a 35°C com valores acima de 1.100 NMP/g nesse tipo de produto (GÓMEZ-ALDAPA et al., 2013; LEÓN et al., 2013; BRANDÃO et al., 2014), uma vez que algumas bactérias do grupo coliformes estão presentes, naturalmente nas hortaliças frescas e no solo (FRANCO; LANDGRAF, 2002; JAY, 2005; FAO, 2008).

Os resultados do presente estudo diferem dos obtidos por Farias et al. (2011) que analisando amostras de saladas de vegetais obtidas em unidades hospitalares no Pará, constataram que 100% das amostras o NMP/g de coliformes a 35°C foi menor que 100.

Em relação ao número mais provável de coliformes a 45°C, os resultados encontrados são semelhantes aos obtidos por Brandão et al. (2014) no Brasil que verificaram uma prevalência de 20% das amostras de saladas de restaurantes com valores acima do padrão, porém são considerados baixos quando comparados a outros estudos realizados no Brasil, os quais relatam prevalência de 70% das amostras de saladas minimamente processadas de supermercados (FRÖDER et al., 2007) e 100% das saladas provenientes de restaurantes com valores acima de 100 NMP/g (ROCHA et al., 2014).

Em pesquisas realizadas com amostras de saladas obtidas em supermercados de Bangladesh (RAHMAN; NOOR, 2012) e saladas de restaurantes no México (CASTRO-ROSAS et al., 2012) a prevalência de amostras com valores de coliformes a 45°C > 100 NMP/g, foi de 85% e 99% respectivamente.

No presente estudo as amostras de saladas submetidas a processamento térmico (CPT) apresentaram menor prevalência de coliformes a 45°C quando comparadas com aquelas sem processamento térmico (SPT).

Esses resultados evidenciam o papel da temperatura na manutenção da inocuidade do produto (ALMUALLA et al., 2010; FARIAS et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2011). León et al. (2013) também verificaram uma menor contaminação nas saladas cozidas provenientes de restaurantes localizados no México.

A temperatura de armazenamento e exposição é de suma importância para garantir a qualidade do PPC (JAY, 2005; ALMUALLA ET AL., 2010). De acordo com a Portaria do Centro de Vigilância Sanitária (CVS-5) de 04/2013 a temperatura dos alimentos frios prontos para o consumo deve ser de 10°C com validade de 4 h ou entre 10°C a 21°C durante 2 h (SÃO PAULO, 2013).

A prevalência maior de coliformes nas saladas tuberosas verificada nesse estudo pode estar associada ao modo de preparo, pois as hortaliças tuberosas consumidas cruas, são submetidas a maiores manipulações, como remoção da casca, corte e triturações, fazendo com que os vegetais recém cortados apresentem teor de umidade mais elevado e maior disposição de nutrientes, além

de aumentar a superfície de contato, favorecendo o crescimento de micro-organismos (JAY, 2005; OLAIMAT; HOLLEY, 2012).

Esses vegetais também estão mais expostos aos poluentes durante a produção primária, pois a parte destinada ao consumo está abaixo do solo (BEVILACQUA, 2014; FAO, 2014). Desta forma se nas etapas que procedem à colheita não forem adotadas medidas de higiene eficientes o produto final poderá conter contaminantes provenientes da fase de cultivo, já que o solo e o adubo são fontes de contaminação na produção primária (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; CEUPPENS et al., 2014).

Ceuppens et al. (2014), analisando os insumos utilizados na produção de alface no Brasil, verificaram que a prevalência de *Salmonella* spp no adubo orgânico (estrume) foi de 5,6% e de 2,6% no solo, e mostraram uma relação significativa entre o número elevado de coliformes a 45°C, com o aumento da prevalência de patógenos.

A água de irrigação também é uma importante fonte de contaminação para as hortaliças cruas durante a produção primária (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; BRANDÃO et al., 2014; CEUPPENS et al., 2014).

De acordo com a Resolução n°. 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o limite máximo de coliformes a 45°C para águas utilizadas na irrigação de hortaliças consumidas cruas é de 200 NMP/100 mL (BRASIL, 2005).

Estudos realizados no Brasil, nas regiões de Botucatu - SP (FRAVET; CRUZ, 2007) e Brasília - DF (ABREU et al., 2010), revelaram que 100% das amostras da água de irrigação das hortas estavam em desacordo com a legislação no que diz respeito ao NMP de coliformes a 45°C.

A presença de coliformes em hortaliças não indica, necessariamente, que houve contaminação fecal, pois algumas cepas do gênero *Enterobacter* e *Klebsiella* possuem as mesmas características dos coliformes a 45°C e são encontradas em outros ambientes, como nas próprias hortaliças frescas e no solo (FRANCO; LANDGRAF, 2002; JAY, 2005). No entanto altos níveis podem comprometer a qualidade sensorial e nutritiva, além de evidenciar práticas de higiene insatisfatórias na etapa de lavagem das hortaliças para o preparo das saladas (SANTOS; SOUSA, 2013; BRANDÃO et al., 2014).

Durante o preparo das saladas, os manipuladores de alimentos e as superfícies de contato constituem-se importantes fontes de contaminação (DJÉNI et al., 2012; BALZARETTI; MARZANO, 2013; BRANDÃO et al., 2014).

No Brasil, Ribeiro et al. (2014) analisaram as condições sanitárias de cozinhas domiciliares e verificaram que 47,5% e 3,8% das mãos da pessoa que manipulavam os alimentos com maior frequência na residência, estavam contaminadas com coliformes a 35°C e *Escherichia coli* respectivamente.

Balzaretti e Marzano (2013) na Itália, avaliaram as condições de higiene de 44 instalações de UAN de 3 aeroportos e constataram que 8,4% e 3,5% do lavado das mãos dos manipuladores de alimentos apresentaram limites insatisfatórios em relação à contagem bacteriana total (CBT) e contagem de estafilococos coagulase positiva respectivamente.

Djéni et al. (2012) avaliaram as condições sanitárias de 775 unidades de produção de attiéké, prato tradicional da Costa do Marfim feito com mandioca, e verificaram a presença elevada de micro-organismos como, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter youngae*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter freundii* nas mãos dos manipuladores de alimentos.

A lavagem das hortaliças deve diminuir o número de micro-organismos (JAY, 2005). Alguns autores mostram a eficiência da solução de hipoclorito na higienização de frutas e hortaliças, contribuindo para a redução de micro-organismos em amostras *in natura* (GOMES, 2011; RODRIGUES et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Rodrigues et al. (2011) avaliaram duas técnicas aplicadas na higienização de hortaliças e frutas, uma utilizava água e sabão e a outra solução de hipoclorito de sódio a 1% com concentração de 100-250 ppm de cloro ativo durante 15 minutos. Somente a segunda técnica mostrou-se eficiente quanto à redução quantitativa de micro-organismos.

Sustentando os dados acima, Costa et al. (2013) verificaram que a imersão em solução detergente a 1% por 3 minutos antes da higienização com solução clorada a 200 ppm por 15 minutos, em amostras de alface *in natura*, foi eficiente, reduzindo o número de coliformes a 45°C, de 346 para 152 NMP/g, em amostras de cultura convencional, e de 57 para 14 NMP/g em alfaces obtidas em sistema orgânico, porém após a higienização com solução clorada, o

NMP/g foi de 152 para 13 nas convencionais, e de 14 para 3 nas orgânicas, mostrando o potencial da solução de hipoclorito na redução de micro-organismos.

Apesar da *Salmonella* spp ser o agente biológico mais comumente associado a surtos de DTA no Brasil (CDC, 2012; BENNETT et al, 2014; BRASIL, 2014), o presente estudo verificou que todas as amostras apresentaram ausência em 25 g, concordando com resultados obtidos por Brandão et al. (2014), De Giusti et al. (2010) e Almualla et al. (2010). Já Araújo et al. (2011) obtiveram uma prevalência de 100% de *Salmonella* spp em saladas cruas de restaurantes de Pombal na Paraíba.

Em outros trabalhos realizados em UAN no Brasil por Fröder et al. (2007), Dias et al. (2011) e Maistro et al. (2012) a prevalência de *Salmonella* spp em amostras de saladas foi de 3%, 28,57% e 16,86%, respectivamente.

A presença de *Salmonella* spp também foi observada em saladas de restaurantes no México onde Gómez-Aldapa et al. (2013) verificaram a prevalência de 6,8% em saladas cruas e León et al. (2013) a prevalência de 1% em saladas cozidas.

Na contagem de estafilococos coagulase positiva, resultados semelhantes foram observados por Almualla et al. (2010) nos Emirados Árabes Unidos que verificaram a prevalência de 100% de saladas obtidas em restaurantes com valores de $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g o que concorda com os limites estabelecidos pela legislação brasileira.

Alves e Ueno (2010), analisando 32 saladas provenientes de restaurantes *self-service* de São Paulo, verificaram que 3,12% apresentaram contagem de estafilococos de $9,85 \times 10^2$ UFC/g. Farias et al. (2011) obtiveram contagem média de $2,1 \times 10^3$ UFC/g em amostras de saladas provenientes de hospitais no Pará.

As refeições servidas pelas UAN hospitalares devem ser seguras em todos os aspectos, principalmente no que diz respeito à sanidade. Embora as DTAs acometam qualquer tipo de pessoa, alguns grupos populacionais são mais suscetíveis, como é o caso de pacientes hospitalizados que estejam com o sistema imune comprometido, esses podem ter o seu quadro agravado diante da ingestão de alimentos contaminados (KONECKA-MATYJEK et al., 2012; SARKER et al., 2014).

Os resultados de trabalhos realizados com amostras de saladas de diferentes tipos de estabelecimentos são comparáveis aos verificados no presente estudo, pois todos são considerados Unidades de Alimentação e Nutrição (U-AN) devendo obedecer aos mesmos parâmetros higiênico-sanitários (PINTO, 2013).

7. Conclusão

O perfil microbiológico das amostras de saladas provenientes de cozinhas hospitalares da região de Bauru e Botucatu mostrou-se compatível com a legislação vigente no que diz respeito à pesquisa de *Salmonella* spp e contagem de estafilococos coagulase positiva, não oferecendo risco microbiológico associado à presença de patógenos.

Porém, no que diz respeito aos indicadores de higiene, NMP de coliformes a 35°C e a 45°C, os resultados foram insatisfatórios, indicando práticas de higiene inadequadas, sobretudo durante a elaboração das saladas.

Portanto deve-se atentar para as práticas de higiene adotadas em todo o processo de elaboração dessas refeições, principalmente pelo fato de serem servidas a indivíduos hospitalizados que podem estar com o sistema imune debilitado ou comprometido.

8. Bibliografia

ABREU, I. M. O.; JUNQUEIRA, A. M. R.; PEIXOTO, J. R.; OLIVEIRA, S. A. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 108-118, 2010.

ALMUALLA, N. A.; LALEYE, L. C.; ABUSHELAIBI, A. A.; AL-QASSEMI, R. A.; WASESA, A. A.; BABOUCARR, J. Aspects of the microbiological quality and safety of ready-to-eat foods in Sharjah supermarkets in the United Arab Emirates. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, n. 7, p. 1328-1331, 2010.

ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 573-580, 2010.

ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. Salmonella. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

ARAÚJO, M. S.; RODRIGUES, M. S. A.; SILVA, R. A. S.; MARTINS, W. F.; ARAÚJO, A. S. Análise microbiológica de saladas servidas em restaurantes da cidade de Pombal – PB. **Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 1, n. 1, p. 1, 2011.

BALZARETTI, C. M.; MARZANO, M. A. Prevention of travel-related foodborne diseases: Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants. **Food Control**, Guildford, v. 29, n. 1, p. 202-207, 2013.

BENNETT, S. Increasing Number and Greater Morbidity and Mortality Associated with Multistate Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1973–2010. In: IAFP Annual Meeting, 2014, Tóquio. **International Association for Food Protection**, 2014.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 9, p. 2385-2397, 2010.

BERTOIA, M. L.; MUKAMAL, K. J.; CAHILL, L. E.; HOU, T.; LUDWIG, D. S.; MOZAFFARIAN, D.; WILLETT, W. C.; HU, F. B.; RIMM, E. B. Increased consumption of fruits and vegetables and weight change over time. **Circulation**, Baltimore, v. 129, n. 1, p. 10, 2014.

BEVILACQUA, H. E. C. R. **Manual da horta**. [s.l.: s.n.], 2014.

BEZERRA, A. C. D.; MANCUSO, A. M. C.; HEITZ, S. J. J. Alimento de rua na agenda nacional de segurança alimentar e nutricional: um ensaio para a qualificação sanitária no Brasil. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1489-1494, 2014.

BOEING, H.; BECHTHOLD, A.; BUB, A.; ELLINGER, A.; HALLER, D.; KROKE, A.; LESCHIK-BONNET, E.; MÜLLER, M. J.; OBERRITTER, H.; SCHULZE, M.; STEHLE, M.; WATZL, B. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, Alemanha, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012.

BRANDÃO, M. L.; ALMEIDA, D. O.; BISPO, F. C.; BRICIO, S. M.; MARIN, V. A.; MIAGOSTOVICH, M. P. Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 5, p. 961-966, 2014.

BRASIL. Resolução nº 12, de 24 de julho de 1978. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 410, p. 2.

BRASIL. Resolução nº12, de 2 de janeiro de 2001 Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de jan. 2001. Seção 1, p. 39.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. **Manual Brasileiro de Acreditação Hospitalar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 109p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e água**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. 194p.

BRASIL. Resolução nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 set. 2004. Seção 2, p. 3.

BRASIL. Resolução nº 380, de 28 de dezembro de 2005. Dispõe sobre a definição das áreas de atuação do nutricionista e suas atribuições, estabelece parâmetros numéricos de referência, por área de atuação, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 dez. 2005. Seção 1, p.10.

BRASIL. Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005 Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2005. Seção 053, p. 58-63.

BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional - SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 set. 2006. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 157p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Curso de Boas Práticas, módulo 4, Gram-positivos *Staphylococcus* spp.** Brasília: ANVISA, 2014. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_sta.htm>. Acesso em: 18 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 10 set. 2014.

BURLANDY, L.; BOCCA, C.; MATTOS, R. A. Mediações entre conceitos, conhecimento e políticas de alimentação, nutrição e segurança alimentar e nutricional. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 9-20, 2012.

CASTRO-ROSAS, J.; CERNA-CORTÉS, J. F.; MÉNDEZ-REYES, E.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; ESTRADA-GARCIA, T. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 2, p. 176-180, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Staphylococcal Food Poisoning.** Atlanta: CDC, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/staphylococcal/#symptoms>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **What is Salmonellosis?** Atlanta: CDC, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>>. Acesso em: 10 out. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Food safety, foodborne disease.** Atlanta: CDC, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tracking and reporting foodborne disease outbreaks.** Atlanta: CDC, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/features/dsfoodborneoutbreaks/>>. Acesso em: 7 out. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Foodborne outbreak online database (food).** Atlanta: CDC, 2014. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>>. Acesso em: 15 out. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***E. coli* (Eschechia coli).** Atlanta: CDC, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

CEUPPENS, S.; HESSEL, C. T.; RODRIGUES, R. Q.; BARTZ, S.; TONDO, E. C.; UYTENDAELE, M. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 181, p. 67-76, 2014.

CONNECTION. **Pesquisa quantitativa do consumo de frutas e hortaliças**. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/Pesquisa%20quantitativa_fruticultura_0.pdf>. Acesso em: 2 set. 2014.

COSTA, E.; FIGUEIREDO, E. A. T.; CHAVES, C.; ALMEIDA, P. C.; VASCONCELOS, N. M.; MAGALHÃES, I. M. C.; MORAES, A. F.; PAIXÃO, L. M. N. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 3, p. 392, 2013.

COSTA, A. C. O.; FERREIRA, J.; ANJOS, M. B.; COZER, M. Análise do conhecimento sobre a higiene das mãos de manipuladores antes e após intervenção educativa. **Revista Multiciência**, São Carlos, v. 12, p. 179-188, 2013.

CUNHA, F. M. F.; MAGALHÃES, M. B. H.; BONNAS, D. S. Desafios da gestão da segurança dos alimentos em unidades de alimentação e nutrição no Brasil: uma revisão: contextos da alimentação. **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, Lisboa, v. 1, n. 2, p. 4-14, 2013.

DA CUNHA, D. T.; STEDEFELDT, E.; DE ROSSO, V. V. He is worse than I am: The positive outlook of food handlers about foodborne disease. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 35, p. 95-97, 2014.

DE GIUSTI, M.; AURIGEMMA, C.; MARINELLI, L.; TUFI, D.; DE MEDICI, D.; DI PASQUALE, S.; VITO, C. D.; BOCCIA, A. The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. **Journal of Applied Microbiology**, Nova Iorque, v. 109, n. 3, p. 996-1006, 2010.

DE SETA, M. H.; O'DWYER, G.; HENRIQUES, P.; SALES, G. L. P. Cuidado nutricional em hospitais públicos de quatro estados brasileiros: contribuições da avaliação em saúde à vigilância sanitária de serviços. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 3413-3422, 2010.

DIAS, H. S.; JÚNIOR, W. R. P.; ZANUTO, M. E.; FONSECA, N. T.; OLIVEIRA, A. S.; PORTO, S. S. Avaliação microbiológica de saladas de vegetais com maionese, servidas em restaurantes comerciais self-service por quilo, na região Central de Vitória da Conquista, BA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 194/195, p.1-2, 2011.

DIEZ-GARCIA, R. W.; SOUSA, A. A.; PROENÇA, R. P. C.; LEANDRO-MERHI, V. A.; MARTINEZ, E. Z. Gauging food and nutritional care quality in hospitals. **Nutrition Journal**, Reino Unido, v. 11, n. 1, p. 66, 2012.

DJÉNI, T. N.; KOUAMÉ, A. K.; TRAORÉ, Y.; NEVRY, R. K.; MARCELLIN, K. D. Assessment of Knowledge, Attitudes and Practices of Food Handlers in Attieke Production Units in Relation to Food Hygiene and Safety in Côte d'Ivoire in 2012. **Food and Nutrition Sciences**, Polônia, v. 5, n. 10, p. 896-904, 2012.

FARIAS, J. K. R.; PEREIRA, M. M. S.; FIGUEIREDO, E. L. Avaliação de boas práticas e contagem microbiológica das refeições de uma unidade de alimentação hospitalar, do município de São Miguel do Guamá - Pará. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 1, p. 113-119, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Good agricultural practices**. Rome: FAO, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/prods/gap/>>. Acesso em: 21 set. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Practical guides: an introduction to the basic concepts of food security**. Rome: FAO, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/013/al936e/al936e00.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Consultancy report on first extension staff training in horticulture. Basic understanding of horticulture**. Rome: FAO, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/x5642e/x5642e06.htm>>. Acesso em: 20 de out. 2014.

FRANÇA, F. C. O.; MENDES, A. C. R.; ANDRADE, I. S.; RIBEIRO, G. S.; PINHEIRO, I. B. Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro. In: SEMINÁRIO ALIMENTAÇÃO E CULTURA NA BAHIA, Bahia, 2012. Disponível em: <http://www2.uefs.br:8081/cer/wp-content/uploads/SANTANA_Elvira.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2014.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 182 p.

FRAVET, A. M. M. F.; CRUZ, R. L. Qualidade da água utilizada para a irrigação de hortas na região de Botucatu – SP. **Irriga**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 144-155, 2007.

FREEDMAN, D. A.; PEÑA-PURCELL, N.; FRIEDMAN, D. B.; ORY, M.; FLOCKE, S.; BARNI, M. T.; HÉBERT, J. R. Extending cancer prevention to improve fruit and vegetable consumption. **Journal of Cancer Education**, Mahwah, v. 29, n. 41, p. 1-6, 2014.

FRÖDER, H.; MARTINS, C. G.; SOUZA, K. L. O.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D.; DESTRO, M. T. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 5, p. 1277-1280, 2007.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, R. I.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, Estados Unidos, v. 327, n. 5967 p. 812-818, 2010.

GOMES, C. U. S. **Avaliação das metodologias de higienização de hortaliças in natura empregadas pela população de Medianeira - PR, utilizando alfaces (*lactuca sativa*) de diferentes fontes de adubação**. 2011. 58 f. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira. 2011.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; CASTRO-ROSAS, J. Frequency and correlation of some enteric indicator bacteria and salmonella in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican restaurants. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 78, n. 8, p. 1201-1207, 2013.

GONÇALVES, J. M.; RODRIGUES, K. L.; DEMOLINER, F.; ROSSALES, R.; ALMEIDA, Â. T. S.; BUCHWEITZ, M. R. D. Hygienic and sanitary conditions in the hospital foodservice: relationship between good practices and microbiological quality. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 33, p. 418-422, 2013.

HAAS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. **Quantitative microbial risk assessment**. 2. ed. New Jersey: John Wiley e Sons, 2014.

HANEKOM, S. M.; VERMEULEN, E. E.; THERON, W. O. Food safety risk factors in a hospital food service unit serving low microbial diets to immune-compromised patients. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, Quênia, v. 10, n. 9, p. 4000-4015, 2010.

HARTLEY, L.; IGBINEDION, E.; HOLMES, J.; FLORES, N.; THOROGOOD, M.; CLARKE, A.; STRANGERS, S.; HOOPER, L.; REES, K. Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Reino Unido, v. 4, n. 6, p. 1-54, 2013.

HOLVOET, K.; SAMPERS, I.; SEYNNAEVE, M.; UYTENDAELE, M. Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 171, p. 21-31, 2014.

IUNG, E.; PONTES, J. B.; ANJOS, M.; COZER, M. Avaliação das condições higiênico-sanitárias e análise microbiológica de manipuladores em um hospital no sudoeste do Paraná. **Revista Multiciência**, São Carlos, v.12, p. 56-64, 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KELLER, H. H.; VESNAVER, E.; DAVIDSON, B.; ALLARD, J.; LAPORTE, M.; BERNIER, P.; PAYETTE, H.; JEEJEEBHOY, K.; DUERKSEN, D.; GRAMLICH, L. Providing quality nutrition care in acute care hospitals: perspectives of nutrition care personnel. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, Reino Unido, v. 27, n. 2, p. 192-202, 2014.

KIM, H.; HWANG, J. Y.; HA, E. H.; PARQUE, H.; HA, M.; LEE, S. H.; HONG, Y. C.; CHANG, N. Fruit and vegetable intake influences the association between exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and a marker of oxidative stress in pregnant women. **European Journal of Clinical Nutrition**, Reino Unido, v. 65, n. 10, p. 1118-1125, 2011.

KNEAFSEY, M.; DOWLER, E.; LAMBIE-MUMFORD, H.; INMAN, A.; COLLIER, R. Consumers and food security: uncertain or empowered? **Journal of Rural Studies**, Reino Unido, v. 29, p. 101-112, 2013.

KONECKA-MATYJEK, E.; MACKIW, E.; KRYGIER, B.; TOMCZUK, K.; STOS, K.; JAROSZ, M. National monitoring study on microbial contamination of food-contact surfaces in hospital kitchens in Poland. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Inglaterra, v. 19, n. 3, p. 457-463, 2012.

KOZAK, G. K.; MACDONALD, D.; LANDRY, L.; FARBER, J. M. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. **Journal Food Protection**, Estados Unidos, v. 76, n. 1, p.173-183. 2013.

KRUK, J. Association between vegetable, fruit and carbohydrate intake and breast cancer risk in relation to physical activity. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Tailândia, v. 15, n. 11, p. 4429-4436, 2014.

LEENDERS, M. et al. Fruit and vegetable consumption and mortality european prospective investigation into cancer and nutrition. **American Journal of Epidemiology**, Estados Unidos, v. 178, n. 18, p. 1-13, 2013.

LEÓN, B. D.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; VÁZQUEZ-BARRIOS, E.; CASTRO-ROSAS, J. Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 414-420, 2013.

LYNNE OLIVER. **Salads**: have questions? Estados Unidos: Food Time Line, 2000. Disponível em: <<http://www.foodtimeline.org/foodsalads.html>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

MADEIRA, N. R.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; GIORDANO, L. B. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, n. 26, p. 428-432, 2008.

MAIA, I. C. M. P.; MONTEIRO, M. A. M.; FONSECA, J. L.; COELHO, M. R. L.; LOPES, S. L. C. Análise da contaminação de utensílios em unidades de alimentação e nutrição hospitalar no município de Belo Horizonte-MG. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 2, p. 265-271, 2011.

MAISTRO, L. C.; MIYA, N. T. N.; SANT'ANA, A. S.; PEREIRA, J. L. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP–Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. **Food Control**, Guildford, v. 28, n. 2, p. 258-264, 2012.

MINNESOTA Department of Health. **Causes and symptoms of foodborne illness**. 2014. Disponível em: <<http://www.health.state.mn.us/divs/idepc/dtopics/foodborne/basics.html>>. Acesso em: 21 mar. 2015.

MONDINI, L.; MORAES, S. A.; FREITAS, I. C. M.; GIMENO, S. G. A. Consumo de frutas e hortaliças por adultos em Ribeirão Preto, SP. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 686-694, 2010.

OLAIMAT, A. N.; HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. **Food Microbiology**, Londres, v. 32, n. 1, p. 1-19, 2012.

OYEBODE, O.; GORDON-DSEAGU, V.; WALKER, A.; MINDELL, J. S. Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. **Journal of Epidemiology e Community Health**, Londres, v. 68, n. 9, p. 856-862, 2014.

PINTO, G. R.; VEDANA, E. C.; ANJOS, M.; COZER, M.; FRANÇA, V. F. Avaliação da estrutura física e higiênico-sanitária de uma unidade de alimentação e nutrição na cidade de Francisco Beltrão - PR. **Revista Multiciência**, São Carlos, v.12, p. 24-38, 2013.

PRADO, S. D.; GUGELMIN, S. A.; MATTOS, R. A.; SILVA, J. K.; OLIVARES, P. S. G. A pesquisa sobre segurança alimentar e nutricional no Brasil de 2000 a 2005: tendências e desafios. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 7-18, 2010.

PUBLIC HEALTH ENGLAND - HPA. **Foodborne outbreaks reported to the Health Protection Agency, England and Wales, 1992 - 2011 (by setting)**. London, 2014. Disponível em: <<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/FoodborneOutbreakSurveillanceAndRiskAssessment/FoodborneOutbreaks/eFOSSFoodborneoutbreaksbysetting19922010/>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

RAHMAN, F.; NOOR, R. Prevalence of pathogenic bacteria in common salad vegetables of Dhaka Metropolis. **Bangladesh Journal of Botany**, Bangladesh, v. 41, n. 2, p. 159-162, 2012.

RAMALHO, A. A.; DALAMARIA, T.; SOUZA, O. F. Consumo regular de frutas e hortaliças por estudantes universitários em Rio Branco, Acre, Brasil: prevalência e fatores associados. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 7, p. 1405-13, 2012.

RAMOS, B.; MILLER, F. A.; BRANDÃO, T. R. S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L. M. Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 20, p. 1-15, 2013.

REETZ, R.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. **Anuário brasileiro de hortaliças**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2014. 86 p.

RIBEIRO, D. T.; CORÇÃO, G.; NORMANN, C. A. M.; ALVES, M. K. Condições higiênicas sanitárias e avaliação microbiológica das mãos de manipuladores em cozinhas residenciais no município de Caxias do Sul, RS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 28, n. 230/231, p. 169-173, 2014.

ROCHA, A. N. F.; SOARES, R. P.; BESERRA, M. L. S. Análise microbiológica de saladas cruas em restaurantes de Teresina - PI. **Revista Interdisciplinar**, Abaetetuba, v. 7, n. 2, p. 11-17, 2014.

RODRIGUES, D. G.; SILVA, N. B. M.; REZENDE, C.; JACOBUECCI, H. B.; FONTANA, E. A. Avaliação de dois métodos de higienização alimentar. **Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 4, n. 3, p. 341-350, 2011.

RODRIGUEZ, M.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; POSADA, G. D.; ZURERA, G. Hygienic conditions and microbiological status of chilled Ready-To-Eat products served in Southern Spanish hospitals. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 6, p. 874-882, 2011.

SÃO PAULO (Estado). Portaria nº 5 do Centro de Vigilância Sanitária de 9 de abril de 2013. **Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo**. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, São Paulo, Seção I, n. 73, p. 32-35, 2013.

SANTOS, N. M.; SOUZA, K. M. C. Microbiological evaluation of hands of foods handlers from public schools in Pirenópolis-GO. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 35-40, 2013.

SARKER, S.; HUSSAIN, M. S.; KHATUN, A.; HOSSAIN, M. A.; ALAM, M. K.; HOSSAIN, M. S. Development of gamma-irradiated low microbial vegetable salads for immunocompromised patients. **Annals Food Science and Technology**, Romênia, v. 15, n. 1, p. 203-219, 2014.

SAS Institute. 2011. *SAS/STAT User's Guide*. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SEGALL-CORRÊA, A. M.; MARIN-LEON, L. A segurança alimentar no Brasil: proposição e usos da Escala Brasileira de Medida da Insegurança Alimentar (EBIA) de 2003 a 2009. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 1-19, 2009.

SENHOR, R. F.; SOUZA, P. A.; CARVALHO, J. N.; SILVAL, F. L.; SILVA, M. Fatores de pré e pós-colheita que afetam os frutos e hortaliças em pós-colheita. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 4, n. 3, p. 13-21, 2009.

SILVA, C. J.; TEJADA, T. S.; TIMM, C. D. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Ceará, v. 8, n. 4, p. 120-131, 2014.

SILVEIRA, J.; GALESKAS, H.; TAPETTI, R.; LOURENCINI, I. Quem é o consumidor brasileiro de frutas e hortaliças?. **Hortifruti Brasil**, Piracicaba, n. 139, p. 8-23, 2011.

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Advances in Nutrition an International Review Journal**, Estados Unidos, v. 3, n. 4, p. 506-516, 2012.

STANGARLIN, L.; HECKTHEUER, L. H.; SERAFIM, A. L.; MEDEIROS, L. B. Evaluation of hygienic-sanitary conditions of hospital nutrition and dietary services from the perspectives of internal and external auditors. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 33, n. 3, p. 521-525, 2013.

TABAN, B. M.; HALKMAN, A. K. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat (RTE) salads carry a risk of foodborne pathogens?. **Anaerobe**, Reino Unido, v. 17, n. 6, p. 286-287, 2011.

THRELFALL, E. J.; WAIN, J.; PETERS, T.; LANE, C.; PINNA, E.; POUÇO, C. L.; GALES, A. D.; DAVIES, R. H. Egg-borne infections of humans with *Salmonella*: not only an *S. enteritidis* problem. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 70, n. 1, p. 15-26, 2014.

UNIVERSITY OF KENTUCKY. College of Agriculture. **Good Agricultural Practices (GAP)**. Kentuck, 2012. Disponível em: <<http://www.uky.edu/Ag/CCD/introsheets/gap.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2014.

VIECELLE, A. C.; PERON, S. C.; ANJOS, M.; COZER, M. Análise do binômio tempo-temperatura dos processos da carne suína em uma unidade de alimentação e nutrição localizada no sudoeste do Paraná. **Revista Multiciência**, São Carlos, v.12, p. 169-179, 2013.

WANG, X.; OUYANG, Y.; LIU, J.; ZHU, M.; ZHAO, G.; BAO, W.; HU, F. B. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **British Medical Journal**, Londres, v. 349, p. 1-14, 2014.

WENDISCH, C. **Avaliação da qualidade de unidades de alimentação e nutrição (UAN) hospitalares**: construção de um instrumento. 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado em modalidade Profissional em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Definition of health.** Geneva: WHO, 1948. Disponível em: <<http://www.who.int/about/definition/en/print.html>>. Acesso em: 21 set. 2014.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Promoting fruit and vegetable consumption around the world.** Geneva: WHO, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>>. Acesso em: 21 set. 2014.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Food security.** Geneva: WHO, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/trade/glossary/story028/en/>>. Acesso em: 15 set. 2014.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Regional office for Europe. Foodborne diseases and causative agents in the European Region.** Geneva: WHO, 2014. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/data-and-statistics>>. Acesso em: 21 de ago. 2014.

9. Trabalho científico

Trabalho a ser enviado para a revista **Semina: Ciências Agrárias**

(Normas para a publicação especificadas no Anexo I)

1 Perfil microbiológico de diferentes tipos de saladas provenientes de cozinhas hospitalares

2 Microbiological profile of different types of salad from hospital kitchens

3 **Resumo**

4 As hortaliças são itens indispensáveis na dieta dos seres humanos, atuando como adjuvantes na prevenção e
5 tratamento de doenças. Porém, destaca-se o aumento de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos
6 (DTAs) associados ao consumo de produtos hortícolas. O objetivo desse trabalho foi verificar o perfil micro-
7 biológico de diferentes tipos de saladas provenientes de cozinhas hospitalares. No período de 2010 a 2014, o
8 Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) recebeu 641 amostras de saladas provenientes de hos-
9 pitais da região de Bauru e Botucatu, onde foram submetidas às análises microbiológicas para a determina-
10 ção do número mais provável (NMP) de coliformes a 35°C e 45°C, pesquisa de *Salmonella* spp e contagem
11 de estafilococos coagulase positiva. Os resultados revelaram que em 30,56% das amostras a contagem de
12 coliformes a 35°C foi maior que 1.100 NMP/g e 12,17% apresentaram coliformes a 45°C acima de 100
13 NMP/g, limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. A prevalência de amostras contaminadas sem
14 tratamento térmico foi de 97,44% e de 2,56% para amostras com tratamento térmico, cozidas ou refogadas.
15 Todas as amostras foram negativas para presença de *Salmonella* spp e apresentaram contagem de estafiloco-
16 cos coagulase positiva $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g. Apesar das amostras de saladas não oferecerem risco microbiológi-
17 co associado à patógenos, deve-se atentar para os micro-organismos indicadores, pois as refeições são servi-
18 das a indivíduos hospitalizados.

19 **Palavras-chave:** Coliformes, Estafilococos coagulase positiva, Hospital, Saladas, *Salmonella* spp.

20 **Abstract**

21 Vegetables crops are indispensable items in human diet, acting as adjuvants in the prevention and treatment
22 of diseases. However, the number of foodborne diseases outbreaks associated with their consumption in-
23 creases. The aim of this study was determine the microbiological profile of different salads from hospital
24 kitchens. In the period between 2010 and 2014 the *Public feeding orientation service* (SOAP) received 641
25 samples of salads from hospital kitchens in the region of Botucatu and Bauru. They, where subjected to mi-
26 crobiological analysis to determine the most probable number (MPN) of coliforms at 35°C and 45°C, besides
27 *Salmonella* spp presence and coagulase-positive staphylococci counts. The results reveal that 30.56% of the
28 samples had counts for coliform at 35°C greater than 1.100 MPN/g and 12.17% had MPN/g of coliforms at
29 45°C above 100 MPN/g, the maximum limit established by Brazilian legislation. The prevalence of samples
30 without heat treatment was 2.56% and 97.44% with heat treatment, cooked or braised. All samples were
31 negative for *Salmonella* spp count and coagulase positive staphylococci $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g. Although most

salads had an adequate microbiological quality, attention should be paid to the safety indicators as the meals are served to hospitalized individuals.

Key words: Coliforms, *Estafilococos* coagulase positiva, Hospital, Salads, *Salmonella* spp.

Introdução

Hortaliça é a planta herbácea da qual uma ou mais partes são utilizadas como alimento na sua forma natural (BRASIL, 1978). Pode ser classificada de acordo com a parte comestível em tuberosas (raízes, bulbos e tubérculos), frutos (legumes e sementes) e verduras (folhas, talos e flores) (BEVILACQUA, 2014; FAO, 2014).

Esses vegetais compõem inúmeros pratos culinários, dentre eles as saladas. Salada é um termo derivado do latim, *sal*, que originou a variação *salata*, que significa coisas salgadas. As saladas são compostas por diversos alimentos, podendo conter apenas hortaliças ou a associação dessas com outros ingredientes (LYNNE OLVER, 2000).

O consumo regular de algumas hortaliças ajuda a prevenir diversas doenças crônicas não transmissíveis, como o Acidente Vascular Cerebral (AVC), *diabetes mellitus* tipo 2, catarata, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer e obesidade (BERTOIA, et al., 2014; OYEBODE et al., 2014; WANG et al., 2014).

Para garantir que os benefícios proporcionados pelo consumo das hortaliças sejam mantidos é essencial que essas e os pratos preparados a partir delas sejam seguros do ponto de vista higiênico sanitário. Nas Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) hospitalares essa questão deve ser prioridade, pois as refeições são destinadas a indivíduos hospitalizados (GONÇALVES et al., 2013; STANGARLIN et al., 2013).

A contaminação das hortaliças pode ocorrer em qualquer fase da produção, podendo ter origem na fase primária como resultado da contaminação de equipamentos e do ambiente (solo, água e ar), durante a pré-colheita e pós-colheita (CEUPPENS et al., 2014).

No preparo das refeições, os manipuladores de alimentos, os utensílios e as superfícies de contato são importantes fontes de contaminação, podendo veicular perigos de origem biológica, química ou física para a salada pronta para o consumo (BALZARETTI; MARZANO, 2013; BRANDÃO et al., 2014).

A maioria das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são causadas por agentes biológicos que podem gerar quadros de infecções, intoxicações e toxinfecções (BRASIL, 2014). Estimativas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) revelam que 48 milhões de americanos ficam doentes a cada ano em decorrência de DTAs, 128 mil são hospitalizados e 3.000 vão a óbito. No período de 2010 a 2014, no Brasil, ocorreram 114 surtos de DTAs em unidades hospitalares enquanto que nos EUA foram notificados 108 surtos no período de 1998 a 2012 (BRASIL, 2014; CDC, 2014).

Os alimentos frequentemente envolvidos em surtos de DTAs são as carnes, frutas e as hortaliças. Os produtos mistos também representam um risco potencial, onde um ingrediente pode vir a contaminar todo o alimento. Tem se aumentado significativamente a ocorrência de DTAs causadas pela ingestão de frutas e vegetais crus e os principais agentes associados aos surtos são a *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (TABAN; HALKMAN, 2011; BENNETT et al., 2014).

Kozak et al. (2013) verificaram os surtos associados a vegetais frescos e frutas no Canadá de 2001 a 2009, no qual 27 itens de origem vegetal estiveram associados com a ocorrência de aproximadamente 1.549 surtos de DTAs. Entre as bactérias mais frequentes estavam a *Salmonella* spp, (50%), *Escherichia coli* (33%) e *Shigella* spp (17%).

Não existe uma síndrome específica associada às DTAs, porém como a porta de entrada se dá pela via oral, as primeiras manifestações clínicas estão associadas ao trato gastrointestinal, mas podem ocorrer manifestações extra-intestinais, acometendo diversos órgãos e sistemas (BRASIL, 2010; CDC, 2012).

Para garantir a inocuidade das hortaliças, bem como dos pratos preparados a partir dessas a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução n.º 12/01 estabelece padrões microbiológicos em relação a alguns contaminantes como a ausência de *Salmonella* spp em 25 g do produto, 10^2 NMP/g de coliformes a 45°C e contagem de estafilococos coagulase positiva $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g (BRASIL, 2001).

Considerando as características atribuídas ao alimento em estudo, como a presença das hortaliças na composição de pratos que fazem parte do hábito alimentar dos brasileiros, principalmente em dietas hospitalares, assim como sua relevância na promoção da saúde, tanto como adjuvante no tratamento de algumas doenças, quanto na causa de surtos de doenças transmitidas por alimentos, são necessárias pesquisas que gerem informações a respeito do perfil microbiológico de refeições servidas em UAN hospitalares.

Desta forma, objetivou-se com o presente estudo verificar o perfil microbiológico de diferentes tipos de saladas provenientes de cozinhas hospitalares, por meio da determinação do número mais provável (NMP) de coliformes a 35°C e 45°C, Pesquisa de *Salmonella* spp e Contagem de estafilococos coagulase positiva.

Material e Métodos

No período de janeiro de 2010 a julho de 2014, o Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) Campus de Botucatu recebeu 641 amostras de saladas provenientes de hospitais localizados nas regiões de Botucatu e Bauru - SP. As amostras foram coletadas em saco coletor estéril e encaminhadas em caixa isotérmica ao laboratório de microbiologia para a realização das seguintes análises: determinação no número mais provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C, pesquisa de *Salmonella* spp e contagem de estafilococos coagulase positiva.

Preparo e diluição das amostras

A pesagem das amostras foi realizada em balança analítica (Gehaka BK 3000) dentro da capela de fluxo laminar (Veco Bio Seg 12). Logo após a limpeza das embalagens com álcool 70% foram pesados assepticamente 25 g das amostras homogeneizadas e adicionados 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% Oxoid, seguido de homogeneização realizada em *Stomacher*. Foi transferido 1 mL desta diluição 10^{-1} para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução salina 0,9%, obtendo a diluição 10^{-2} e repetido mais uma vez para diluição 10^{-3} .

Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes a 35°C e 45°C

As análises foram realizadas de acordo com as metodologias preconizadas pela Instrução Normativa (IN) n.º 62/03 (BRASIL, 2003).

1. Prova Presuntiva

Após a obtenção das diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foi inoculado 1 mL de cada diluição em cada tubo contendo 1 tubo de Durham e 9 mL de Lauril Sulfato de Sódio (LSS) Oxoid.

A diluição 10^{-1} foi inoculada em cada tubo na primeira série de 3 tubos, a 10^{-2} na segunda série e a 10^{-3} na terceira. As amostras foram incubadas em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 24h00 a 48h00.

2. Prova Confirmativa

Cada tubo positivo de LSS (produção de gás no tubo de Durham) obtido na prova presuntiva foi repicado com o auxílio da alça de platina, para tubos contendo caldo Verde Brilhante Bile (VBB) Oxoid para a confirmação de coliformes a 35°C e caldo *Escherichia coli* (EC) Oxoid para a confirmação de coliformes a 45°C , ambos com tubos de Durham, onde foram incubados, respectivamente, em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e banho-maria a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24h00 a 48h00.

3. Leitura

A positividade de coliformes a 35°C e a 45°C se deu pela produção de gás dentro do tubo de Durham. O número de tubos positivos em cada diluição foi confrontado na tabela estatística padrão para determinação do NMP.

Pesquisa de *Salmonella* spp

A pesquisa de *Salmonella* spp foi realizada segundo a metodologia preconizada por Andrews et al. (2011), conforme etapas descritas a seguir:

1. Pré-enriquecimento

A alíquota de 25 g de amostra previamente pesada e adicionada de 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% Oxoid foi incubada em estufa bacteriológica por 24h00 $\pm$ 02h00 a 35°C .

2. Enriquecimento Seletivo

Da mistura pré-enriquecida, foi transferido com o auxílio de uma pipeta estéril 0,1 mL e 1 mL para tubos contendo 10 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) Oxoid e 10 mL de caldo Tetrationato (TT) Oxoid, respectivamente. Os caldos RV e TT foram incubados durante 18h00 $\pm$ 02h00 a $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em banho-maria.

3. Plaqueamento Seletivo

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, foram realizadas estrias em placas com ágar Bismuto Sulfito (BS) Oxoid e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) Oxoid, sendo as mesmas incubadas a seguir em estufa bacteriológica por 24h00 $\pm$ 02h00 a 35°C .

4. Identificação bioquímica

As colônias características de *Salmonella* spp foram repicadas para tubos contendo TSI (Triple Sugar Iron) e LIA (Lisina Iron Agar) que foram incubados a 35°C por 18h00 a 24h00.

Foram ainda realizados os seguintes testes bioquímicos: produção de indol, reação de Vermelho de Metila e de Voges-Proskauer, Citrato de Simmons, produção de urease, utilização de glicose e lactose, observação do movimento e produção de fenilalanina desaminase.

5. Soroaglutinação

Foi realizada empregando-se anti-soro somático (Antígeno O).

Contagem de estafilococos coagulase positiva.

As análises foram realizadas de acordo com as metodologias preconizadas pela Instrução Normativa (IN) n.º 62/03 (BRASIL, 2003).

1. Diluição e plaqueamento seletivo

Após a pesagem e diluição das amostras foi semeado 0,1 mL da diluição 10^{-1} em placas contendo ágar Baird-Parker (BP) Oxoid. Com o auxílio da alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio de cultura, até a sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas em estufa a uma temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30h00 a 48h00.

2. Leitura

As placas que continham entre 20 a 200 colônias foram selecionadas para leitura. As colônias típicas (T) e atípicas (A) foram contadas e registradas separadamente. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias de cada tipo (T) e (A) e cada colônia foi semeada em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24h00.

Prova da coagulase

Foram transferidos 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 06h00, após esse período foi verificada a presença de coágulos.

Coleta de dados

A coleta dos resultados foi realizada através da verificação dos laudos gerados pelo Programa de Gerenciamento das Amostras para Análise (PGAA). As informações foram coletadas em planilha do Excel 2010 para posterior análise estatística.

Análise estatística

A distribuição dos valores de NMP para Coliformes a 35°C foi verificada através dos gráficos quantil-quantil e boxplot, verificando-se ausência de normalidade. A análise estatística procedeu-se utilizando o teste não paramétrico para amostras independentes de Wilcoxon através do PROC NPAR1WAY (SAS, 2011), visto que a transformação em escala logarítmica não foi efetiva para a normalização. No entanto, os resultados foram expressos graficamente em escala logarítmica para melhor visualização.

Um modelo de regressão logística foi utilizado através do PROC GLIMMIX (SAS, 2011) para estimar as chances de encontrar amostras consideradas positivas para coliformes a 45°C como função das variáveis explanatórias: processamento térmico e a categoria da hortaliça. O termo de interação entre processamento térmico e a categoria da hortaliça foi testado no modelo. Os resultados foram apresentados em porcentagem. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

No período de janeiro de 2010 a julho de 2014, foram analisadas 641 amostras de saladas provenientes de cozinhas hospitalares localizadas na região de Bauru e Botucatu. Dessas, 607 (94,70%) não foram submetidas a nenhum tipo de processamento térmico (SPT) e 34 (5,30%) passaram por processamento térmico, cozidas ou refogadas (CPT).

De acordo com a parte da hortaliça destinada para o consumo, as amostras foram categorizadas em folhas, frutos e tuberosas. Um 4º grupo, denominado mistas, foi criado para categorizar as amostras compostas por mais de um ingrediente (Tabela 2).

Todas as amostras 641 (100%) apresentaram ausência de *Salmonella* spp em 25 g e contagem de estafilococos coagulase positiva $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g.

Do total de amostras, 196 (30,60%) apresentaram presença de coliformes a 35°C maior que 1.100 NMP/g. A mediana (min-max) foi de 93 (0,3-24.000) para amostras SPT e 10 (3-2.400) para as amostras CPT ($p=0,01$).

A Figura 1 mostra o NMP de coliformes a 35°C nas saladas de acordo com a categoria. Das 4 categorias analisadas, apenas as folhas apresentaram diferença estatística em relação as mistas e tuberosas ($p<0,05$).

A porcentagem total de amostras positivas para coliforme a 45°C acima de 100 NMP/g, limite padrão estabelecido pela legislação foi de 78 (12,17%) onde 76 (97,44%) eram amostras SPT e 2 (2,56%) amostras CPT. As chances das amostras SPT serem positivas foram 6,98 maiores quando comparadas com as amostras do grupo CPT, com intervalo de confiança de 95% (IC): (1,48-32,65) apresentando diferença estatística ($p<0,05$).

Na tabela 3 as hortaliças tuberosas foram as que apresentaram maior porcentagem de positividade para a presença de coliformes a 45°C acima dos limites estabelecidos pela legislação, 15 (44,12%), apresentando diferença estatística em relação às outras categorias ($p<0,05$). As tuberosas tiveram 10,53 (4,73-23,55) mais chances de serem positivas do que as folhas, 8,93 (2,17-37,03) em relação aos frutos e 3,55 (1,31-10,00) quando comparadas com as mistas.

Também houve diferença estatística ($p<0,05$) entre mistas e folhas, onde as mistas tiveram 2,98 (1,32-6,71) mais chances de serem positivas do que as folhas. Não houve diferença estatística entre frutos e folhas e entre mistas e frutos ($p>0,05$).

Discussão

Apesar de não existir padrão na legislação brasileira para o NMP de coliformes a 35°C, o número elevado desses micro-organismos em produtos prontos para o consumo (PPC) fornece informações sobre as práticas de higiene adotadas antes, durante e após o seu processamento, assim como as condições microbiológicas do produto fresco (JAY, 2005; OLAIMAT; HOLLEY, 2012).

Corroborando com os resultados encontrados, diversos autores relatam a ocorrência de coliformes a 35°C com valores acima de 1.100 NMP/g nesse tipo de produto (GÓMEZ-ALDAPA et al., 2013; LEÓN et al., 2013; BRANDÃO et al., 2014), uma vez que algumas bactérias do grupo coliformes estão presentes, naturalmente nas hortaliças frescas e no solo (FRANCO; LANDGRAF, 2002; JAY, 2005).

Os resultados do presente estudo diferem dos obtidos por Farias et al. (2011) que analisando amostras de saladas de vegetais obtidas em unidades hospitalares no Pará, constataram que em 100% das amostras o NMP/g de coliformes a 35°C foi menor que 100.

Em relação ao número mais provável de coliformes a 45°C, os resultados encontrados são semelhantes aos obtidos por Brandão et al. (2014) no Brasil que verificaram uma prevalência de 20% das amostras de

saladas de restaurantes com valores acima do padrão, porém são considerados baixos quando comparados a outros estudos realizados no Brasil, os quais relatam prevalência de 70% das amostras de saladas minimamente processadas de supermercados (FRÖDER et al., 2007) e 100% das saladas provenientes de restaurantes (ROCHA et al., 2014) com valores acima de 100 NMP/g.

Em pesquisas realizadas com amostras de saladas obtidas em supermercados de Bangladesh (RAHMAN; NOOR, 2012) e saladas de restaurantes no México (CASTRO-ROSAS et al., 2012) a prevalência de amostras com valores de coliformes a 45°C > 100 NMP/g, foi de 85% e 99% respectivamente.

No presente estudo as amostras de saladas submetidas a processamento térmico (CPT) apresentaram menor prevalência de coliformes a 45°C quando comparadas com aquelas sem processamento térmico (SPT). Esses resultados evidenciam o papel da temperatura para a manutenção da inocuidade do produto (ALMUALLA et al., 2010; FARIAS et al., 2011). León et al. (2013) também verificaram uma menor contaminação nas saladas cozidas quando comparadas com as cruas em restaurantes localizados no México.

A temperatura de armazenamento e exposição é de suma importância para garantir a qualidade do PPC (JAY, 2005; ALMUALLA et al., 2010). De acordo com a Portaria do Centro de Vigilância Sanitária (CVS-5) de 04/2013 a temperatura dos alimentos frios prontos para o consumo deve ser de 10°C com validade de 4 horas ou entre 10°C a 21°C durante 2 horas (SÃO PAULO, 2013).

Concernente ao tipo de hortaliça, a prevalência maior de coliformes nas saladas preparadas com tuberosas verificada nesse estudo, pode estar associada ao modo de preparo, pois as hortaliças tuberosas consumidas cruas, são mais manipuladas, como remoção da casca, corte e triturações, fazendo com que os vegetais recém cortados apresentem teor de umidade mais elevado e maior disposição de nutrientes, além de aumentar a superfície de contato, favorecendo o crescimento de micro-organismos (JAY, 2005; OLAIMAT; HOLLEY, 2012).

Esses vegetais também estão mais expostos aos contaminantes durante a produção primária, pois a parte destinada ao consumo está abaixo do solo (BEVILACQUA, 2014; FAO, 2014). Desta forma se nas etapas que procedem à colheita não forem adotadas medidas de higiene eficientes o produto final poderá conter contaminantes provenientes da fase de cultivo, já que o solo e o adubo são fontes de contaminação na produção primária (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; CEUPPENS et al., 2014).

Ceuppens et al. (2014), analisando os insumos utilizados na produção de alface no Brasil, verificaram que a prevalência de *Salmonella* spp no adubo orgânico (estrume) foi de 5,6% e de 2,6% no solo, e mostraram uma relação significativa entre o número elevado de coliformes a 45°C, com o aumento da prevalência de patógenos.

A água de irrigação também é uma importante fonte de contaminação para as hortaliças cruas durante a produção primária (OLAIMAT; HOLLEY, 2012; BRANDÃO et al., 2014; CEUPPENS et al., 2014). De acordo com a Resolução nº. 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o limite máximo de coliformes a 45°C para águas utilizadas na irrigação de hortaliças consumidas cruas é de 200 NMP/100 mL (BRASIL, 2005).

Estudos realizados no Brasil, nas regiões de Botucatu - SP (FRAVET; CRUZ, 2007) e Brasília - DF (ABREU et al., 2010), revelaram que 100% das amostras de água de irrigação das hortas estavam em desacordo com a legislação no que diz respeito ao NMP de coliformes a 45°C.

A presença de coliformes em hortaliças não indica, necessariamente, que houve contaminação fecal, pois algumas cepas do gênero *Enterobacter* e *Klebsiella* possuem as mesmas características dos coliformes a 45°C e são encontradas em outros ambientes, como nas próprias hortaliças frescas e no solo (FRANCO; LANDGRAF, 2002; JAY, 2005). No entanto altos níveis podem comprometer a qualidade sensorial e nutricional, além de evidenciar práticas de higiene insatisfatórias na etapa de lavagem das hortaliças para o preparo das saladas (SANTOS; SOUSA, 2013; BRANDÃO et al., 2014).

Durante o preparo das saladas, os manipuladores de alimentos e as superfícies de contato constituem-se importantes fontes de contaminação (DJÉNI et al., 2012; BALZARETTI; MARZANO, 2013; BRANDÃO et al., 2014).

No Brasil, Ribeiro et al. (2014) analisaram as condições sanitárias de cozinhas domiciliares e verificaram que 47,5% e 3,8% das mãos da pessoa que manipulavam os alimentos com maior frequência na residência, estavam contaminadas com coliformes a 35°C e *Escherichia coli* respectivamente.

Balzaretti e Marzano (2013) na Itália, avaliaram as condições de higiene de 44 instalações de UAN de 3 aeroportos e constataram que 8,4% e 3,5% do lavado das mãos dos manipuladores de alimentos apresentaram limites insatisfatórios no que diz respeito à contagem bacteriana total (CBT) e contagem de estafilococos coagulase positiva respectivamente.

Djéni et al. (2012) avaliaram as condições sanitárias de 775 unidades de produção de attiéké, prato tradicional da Costa do Marfim feito com mandioca, e verificaram a presença elevada de micro-organismos como, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter youngae*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter freundii* nas mãos dos manipuladores de alimentos.

A lavagem das hortaliças deve diminuir o número de micro-organismos (JAY, 2005). Alguns autores mostram a eficiência da solução de hipoclorito na higienização de frutas e hortaliças, contribuindo para a redução de micro-organismos em amostras *in natura* (RODRIGUES et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Rodrigues et al. (2011) avaliaram duas técnicas aplicadas na higienização de hortaliças e frutas, uma utilizava água e sabão e a outra solução de hipoclorito de sódio a 1% com concentração de 100-250 ppm de cloro ativo durante 15 minutos. Somente a segunda técnica mostrou-se eficiente quanto à redução quantitativa de micro-organismos.

Sustentando os dados acima, Costa et al. (2013) verificaram que a imersão em solução detergente a 1% por 3 minutos antes da higienização com solução clorada a 200 ppm por 15 minutos, em amostras de alface *in natura*, foi eficiente, reduzindo o número de coliformes a 45°C, de 346 para 152 NMP/g, em amostras de cultura convencional, e de 57 para 14 NMP/g em alfaces obtidas em sistema orgânico, porém após a higienização com solução clorada, o NMP/g foi de 152 para 13 nas convencionais, e de 14 para 3 nas orgânicas, mostrando o potencial da solução de hipoclorito na redução de micro-organismos.

Apesar da *Salmonella* spp ser o agente biológico mais comumente associado a surtos de DTA no Brasil (CDC, 2012; BENNETT et al, 2014; BRASIL, 2014), o presente estudo verificou que todas as amostras apresentaram ausência em 25 g, concordando com resultados obtidos por Brandão et al. (2014) e Almualia et al. (2010). Já Araújo et al. (2011) obtiveram uma prevalência de 100% de *Salmonella* spp em saladas cruas de restaurantes de Pombal na Paraíba.

Em outros trabalhos realizados em UAN no Brasil por Fröder et al. (2007), Dias et al. (2011) e Maistro et al. (2012) a prevalência de *Salmonella* spp em amostras de saladas foi de 3%, 28,57% e 16,86%, respectivamente.

A presença de *Salmonella* spp também foi observada em saladas de restaurantes no México onde Gómez-Aldapa et al. (2013) verificaram a prevalência de 6,8% em saladas cruas e León et al. (2013) a prevalência de 1% em saladas cozidas.

Na contagem de estafilococos coagulase positiva, resultados semelhantes foram observados por Almualia et al. (2010) nos Emirados Árabes Unidos que verificaram a prevalência de 100% de saladas obtidas em restaurantes com valores de $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g concordando com os limites estabelecidos pela legislação brasileira.

Alves e Ueno (2010), analisando 32 saladas provenientes de restaurantes *self-service* de São Paulo, verificaram que 3,12% apresentaram contagem de estafilococos de $9,85 \times 10^2$ UFC/g. Farias et al. (2011) obtiveram contagem média de $2,1 \times 10^3$ UFC/g em amostras de saladas provenientes de hospitais no Pará.

As refeições servidas pelas UAN hospitalares devem ser seguras em todos os aspectos, principalmente no que diz respeito à higiene. Embora as DTAs acometam qualquer tipo de pessoa, alguns grupos populacionais são mais suscetíveis, como é o caso de pacientes hospitalizados que estejam com o sistema imune comprometido, esses podem ter o seu quadro agravado diante da ingestão de alimentos contaminados (KONEC-KA-MATYJEK et al., 2012; SARKER et al., 2014).

Os resultados de trabalhos realizados com amostras de saladas de diferentes tipos de estabelecimentos são comparáveis aos verificados no presente estudo, pois todos são considerados Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) devendo obedecer aos mesmos parâmetros higiênico-sanitários (PINTO, 2013).

Conclusão

O perfil microbiológico das amostras de saladas provenientes de cozinhas hospitalares da região de Bauru e Botucatu mostrou-se compatível com a legislação vigente no que diz respeito à pesquisa de *Salmonella* spp e contagem de estafilococos coagulase positiva, não oferecendo risco microbiológico associado à presença de patógenos.

Porém, no que diz respeito aos indicadores de higiene, NMP de coliformes a 35°C e a 45°C, os resultados foram insatisfatórios, indicando práticas de higiene inadequadas, sobretudo durante a elaboração das saladas.

Portanto deve-se atentar para as práticas de higiene adotadas em todo o processo de elaboração dessas refeições, principalmente pelo fato de serem servidas a indivíduos hospitalizados que podem estar com o sistema imune debilitado ou comprometido.

Agradecimentos

Ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e aos docentes e discentes que de alguma forma contribuíram para a consolidação desse projeto.

Referências

- ABREU, I. M. O.; JUNQUEIRA, A. M. R.; PEIXOTO, J. R.; OLIVEIRA, S. A. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 1, p. 108-118, 2010.
- ALMUALLA, N. A.; LALEYE, L. C.; ABUSHELAIBI, A. A.; AL-QASSEMI, R. A.; WASESA, A. A.; BABOUCARR, J. Aspects of the microbiological quality and safety of ready-to-eat foods in Sharjah supermarkets in the United Arab Emirates. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 73, n. 7, p. 1328-1331, 2010.
- ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 23, n. 4, p. 573-580, 2010.
- ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. Salmonella. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*. 8. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2015.
- ARAÚJO, M. S.; RODRIGUES, M. S. A.; SILVA, R. A. S.; MARTINS, W. F.; ARAÚJO, A. S. Análise microbiológica de saladas servidas em restaurantes da cidade de Pombal – PB. *Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Pombal, v. 1, n. 1, p. 1, 2011.
- BALZARETTI, C. M.; MARZANO, M. A. Prevention of travel-related foodborne diseases: Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants. *Food control*, Guildford, v. 29, n. 1, p. 202-207, 2013.
- BENNETT, S. Increasing Number and Greater Morbidity and Mortality Associated with Multistate Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1973–2010. In: 2014 ANNUAL MEETING, 2014, Tóquio, *International Association for Food Protection*, Des Moines, 2014.
- BERTOIA, M. L.; MUKAMAL, K. J.; CAHILL, L. E.; HOU, T.; LUDWIG, D. S.; MOZAFFARIAN, D.; WILLETT, W. C.; HU, F. B.; RIMM, E. B. Increased consumption of fruits and vegetables and weight change over time. *Circulation*, Baltimore, v. 129, n. 1, p. 10, 2014.
- BEVILACQUA, H. E. C. R. *Manual da horta*. [S.l.: s.n.], 2014.

- 358 BRANDÃO, M. L.; ALMEIDA, D. O.; BISPO, F. C.; BRICIO, S. M.; MARIN, V. A.; MIAGOSTOVICH,
359 M. P. Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Let-
360 tuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of food science*, Chicago, v. 79, n. 5, p. 961-966,
361 2014.
- 362 BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 12, de 24 de julho de 1978. *Aprova as Normas Técnicas*
363 *Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos -*
364 *CNNPA, relativas a alimentos e bebidas, para efeito em todo território brasileiro*. Diário Oficial [da]
365 República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 410, p. 2.
- 366 BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº12, de 2 de janeiro de 2001. *Aprova o Regulamento Técnico*
367 *sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder
368 Executivo, Brasília, DF, 10 de jan. 2001. Seção 1, p. 39.
- 369 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto
370 de 2003. *Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e água*. Brasília,
371 DF, 2003. 194p.
- 372 BRASIL. Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e*
373 *diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de*
374 *lançamento de efluentes, e dá outras providências*. Coleção de Leis da República Federativa do Brasil,
375 Brasília, DF, v. 053, p. 58-63, mar. 2005.
- 376 BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmiti-*
377 *das por alimentos*. Brasília, DF, 2010. 157p.
- 378 BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos*. Brasília,
379 DF, 2014. Disponível em: <
380 [http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologi](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)
381 [ca-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2014.
- 382 CASTRO-ROSAS, J.; CERNA-CORTÉS, J. F.; MÉNDEZ-REYES, E.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.;
383 GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; ESTRADA-GARCIA, T. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and di-
384 arrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated
385 sewage water. *International journal of food microbiology*, Amsterdam, v. 156, n. 2, p. 176-180, 2012.
- 386 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Food safety, foodborne disease. Atlan-*
387 *ta, 2012*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

- 388 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Foodborne outbreak online database*
 389 *(food)*. Atlanta, 2014. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>>. Acesso em:
 390 15 fev. 2015.
- 391 CEUPPENS, S.; HESSEL, C. T.; RODRIGUES, R. Q.; BARTZ, S.; TONDO, E. C.; UYTENDAELE, M.
 392 Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food*
 393 *Microbiology*, Amsterdam, v. 181, p. 67-76, 2014.
- 394 COSTA, E.; FIGUEIREDO, E. A. T.; CHAVES, C.; ALMEIDA, P. C.; VASCONCELOS, N. M.; MAGA-
 395 LHÃES, I. M. C.; MORAES, A. F.; PAIXÃO, L. M. N. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sati-*
 396 *va*) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização. *Alimentos e Nutrição*, Arara-
 397 quara, v. 23, n. 3, p. 392, 2013.
- 398 DIAS, H. S.; JÚNIOR, W. R. P.; ZANUTO, M. E.; FONSECA, N. T.; OLIVEIRA, A. S.; PORTO, S. S.
 399 Avaliação microbiológica de saladas de vegetais com maionese, servidas em restaurantes comerciais self-
 400 service por quilo, na região Central de Vitória da Conquista, BA. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.
 401 25, n. 194/195, p.1-2, 2011.
- 402 DJÉNI, T. N.; KOUAMÉ, A. K.; TRAORÉ, Y.; NEVRY, R. K.; MARCELLIN, K. D. Assessment of Know-
 403 ledge, Attitudes and Practices of Food Handlers in Attieke Production Units in Relation to Food Hygiene and
 404 Safety in Côte d'Ivoire in 2012. *Food and Nutrition Sciences*, Polônia, v. 5, n. 10, p. 896-904, 2014.
- 405 FARIAS, J. K. R.; PEREIRA, M. M. S.; FIGUEIREDO, E. L. Avaliação de boas práticas e contagem micro-
 406 biológica das refeições de uma unidade de alimentação hospitalar, do município de São Miguel do Guamá -
 407 Pará. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 22, n. 1, p. 113-119, 2011.
- 408 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Consultancy re-*
 409 *port on first extension staff training in horticulture. Basic understanding of horticulture*. 2014. Disponível
 410 em: <<http://www.fao.org/docrep/x5642e/x5642e06.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- 411 FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
 412 182 p.
- 413 FRAVET, A. M. M. F.; CRUZ, R. L. Qualidade da água utilizada para a irrigação de hortas na região de
 414 Botucatu – SP. *Irriga*, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 144-155, 2007.
- 415 FRÖDER, H.; MARTINS, C. G.; SOUZA, K. L. O.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D.; DESTRO, M. T.
 416 Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. *Journal Food Protection*, Des Moines,
 417 v. 70, n. 5, p. 1277-1280, 2007.

- 418 GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; CASTRO-ROSAS, J. Frequency and correlation of
419 some enteric indicator bacteria and salmonella in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican restau-
420 rants. *Journal of food science*, Chicago, v. 78, n. 8, p. 1201-1207, 2013.
- 421 GONÇALVES, J. M.; RODRIGUES, K. L.; DEMOLINER, F.; ROSSALES, R.; ALMEIDA, Â. T. S.;
422 BUCHWEITZ, M. R. D. Hygienic and sanitary conditions in the hospital foodservice: relationship between
423 good practices and microbiological quality. *Journal of Food Safety*, Westport, v. 33, p. 418-422, 2013.
- 424 JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- 425 KONECKA-MATYJEK, E.; MACKIW, E.; KRYGIER, B.; TOMCZUK, K.; STOS, K.; JAROSZ, M. Na-
426 tional monitoring study on microbial contamination of food-contact surfaces in hospital kitchens in Poland.
427 *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Inglaterra, v. 19, n. 3, p. 457-463, 2012.
- 428 KOZAK, G. K.; MACDONALD, D.; LANDRY, L.; FARBER, J. M. Foodborne outbreaks in Canada linked
429 to produce: 2001 through 2009. *Journal Food Protection*, Estados Unidos, v. 76, n. 1, p.173-183. 2013.
- 430 LEÓN, B. D.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; VÁZQUEZ-BARRIOS, E.; CA-
431 STRO-ROSAS, J. Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* patho-
432 types on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants. *Letters in applied microbiology*,
433 Oxford, v. 56, n. 6, p. 414-420, 2013.
- 434 LYNNE OLVER. *Salads: Have questions? Estados Unidos: Food Time Line, 2000*. Disponível em:
435 <<http://www.foodtimeline.org/foodsalads.html>>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- 436 MAISTRO, L. C.; MIYA, N. T. N.; SANT'ANA, A. S.; PEREIRA, J. L. Microbiological quality and safety
437 of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP–Brazil, as assessed by traditional and alterna-
438 tive methods. *Food Control*, Guildford, v. 28, n. 2, p. 258-264, 2012.
- 439 OLAIMAT, A. N.; HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review.
440 *Food Microbiology*, Londres, v. 32, n. 1, p. 1-19, 2012.
- 441 OYEBODE, O.; GORDON-DSEAGU, V.; WALKER, A.; MINDELL, J. S. Fruit and vegetable consumption
442 and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. *Journal of Epidemiol-
443 ogy e Community Health*, Londres, v. 68, n. 9, p. 856-862, 2014.
- 444 PINTO, G. R.; VEDANA, E. C.; ANJOS, M.; COZER, M.; FRANÇA, V. F. Avaliação da estrutura física e
445 higiênico-sanitária de uma unidade de alimentação e nutrição na cidade de Francisco Beltrão - PR. *Revista
446 Multiciência*, São Carlos, v.12, p. 24-38, 2013.
- 447 RAHMAN, F.; NOOR, R. Prevalence of pathogenic bacteria in common salad vegetables of Dhaka Metro-
448 polis. *Bangladesh Journal of Botany*, Bangladesh, v. 41, n. 2, p. 159-162, 2012.

- 449 RIBEIRO, D. T.; CORÇÃO, G.; NORMANN, C. A. M.; ALVES, M. K. Condições higiênicas e
450 avaliação microbiológica das mãos de manipuladores em cozinhas residenciais no município de Caxias do
451 Sul, RS. *Revista Higiene Alimentar*, Brasil, v. 28, n. 230/231, p. 169-173, 2014.
- 452 ROCHA, A. N. F.; SOARES, R. P.; BESERRA, M. L. S. Análise microbiológica de saladas cruas em restau-
453 rantes de Teresina - PI. *Revista Interdisciplinar*, Abaetetuba, v. 7, n. 2, p. 11-17, 2014.
- 454 RODRIGUES, D. G.; SILVA, N. B. M.; REZENDE, C.; JACOBUCCI, H. B.; FONTANA, E. A. Avaliação
455 de dois métodos de higienização alimentar. *Saúde e Pesquisa*, Maringá, v. 4, n. 3, p. 341-350, 2011.
- 456 SANTOS, N. M.; SOUZA, K. M. C. Microbiological evaluation of hands of foods handlers from public
457 schools in Pirenópolis-GO. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, Brasil, v. 4, n. 1, p. 35-40, 2013.
- 458 SÃO PAULO (Estado). Portaria nº 5 do Centro de Vigilância Sanitária de 9 de abril de 2013. *Aprova o*
459 *regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de*
460 *alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo*. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, São Paulo, Seção
461 I, n. 73, p. 32-35, 2013.
- 462 SARKER, S.; HUSSAIN, M. S.; KHATUN, A.; HOSSAIN, M. A.; ALAM, M. K.; HOSSAIN, M. S. Devel-
463 opment of gamma-irradiated low microbial vegetable salads for immunocompromised patients. *Annals Food*
464 *Science and Technology*, Romênia, v. 15, n. 1, p. 203-219, 2014.2014.
- 465 SAS Institute. 2011. *SAS/STAT User's Guide*. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- 466 STANGARLIN, L.; HECKTHEUER, L. H.; SERAFIM, A. L.; MEDEIROS, L. B. Evaluation of hygienic-
467 sanitary conditions of hospital nutrition and dietary services from the perspectives of internal and external
468 auditors. *Food Science and Technology*, Campinas, v. 33, n. 3, p. 521-525, 2013.
- 469 TABAN, B. M.; HALKMAN, A. K. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat (RTE) salads carry a
470 risk of foodborne pathogens?. *Anaerobe*, Reino Unido, v. 17, n. 6, p. 286-287, 2011.
- 471 WANG, X.; OUYANG, Y.; LIU, J.; ZHU, M.; ZHAO, G.; BAO, W.; HU, F. B. Fruit and vegetable con-
472 sumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-
473 response meta-analysis of prospective cohort studies. *British Medical Journal*, Londres, v. 349, p. 1-14,
474 2014.
- 475

Tabela 1. Porcentagem de amostras SPT e CPT e porcentagem total das saladas analisadas no SOAP no período de 2010 a 2014

47

Amostras	SPT (%)	CPT (%)	Total (%)
Frutos	26 (89,65)	3 (10,34)	29 (4,52)
Abóbora	1 (50)	1 (50)	2 (0,31)
Abobrinha	1 (100)	0 (0)	1 (0,16)
Berinjela	6 (0,75)	2 (25)	8 (1,25)
Tomate	14 (100)	0 (0)	14 (2,18)
Pepino	4 (100)	0 (0)	4 (0,62)
Folhas	521 (98,67)	7 (1,32)	528 (82,37)
Acelga	34 (97,14)	1 (2,86)	35 (5,46)
Agrião	48 (100)	0 (0)	48 (7,49)
Alface	155 (100)	0 (0)	155 (24,18)
Almeirão	87 (100)	0 (0)	87 (13,57)
Cebolinha	2 (100)	0 (0)	2 (0,31)
Cheiro verde	9 (100)	0 (0)	9 (1,40)
Chicória	9 (100)	0 (0)	9 (1,40)
Couve manteiga	25 (83,33)	5 (16,67)	30 (4,68)
Escarola	42 (100)	0 (0)	42 (6,55)
Espinafre	2 (100)	0 (0)	2 (0,31)
Repolho	37 (97,37)	1 (2,63)	38 (5,93)
Rúcula	69 (100)	0 (0)	69 (10,76)
Salsinha	2 (100)	0 (0)	2 (0,31)
Tuberosas	26 (76,47)	8 (23,52)	34 (5,30)
Batata	0 (0)	2 (100)	2 (0,31)
Beterraba	11 (1000)	0 (0)	11 (1,72)
Cebola	1 (1000)	0 (0)	1 (0,16)
Cenoura	14 (70)	6 (30)	20 (3,12)
Mista	34 (68)	16 (32)	50 (7,8)
Total	607 (94,70)	34 (5,30)	641 (100)

SPT: Sem Processamento Térmico e CPT: Com Processamento Térmico

476

477

478

479

480

Tabela 2. Número e porcentagem de amostras acima do limite de 10^2 NMP/g de coliformes a 45°C estabelecido pela Resolução n.º 12/01 dividido por categoria

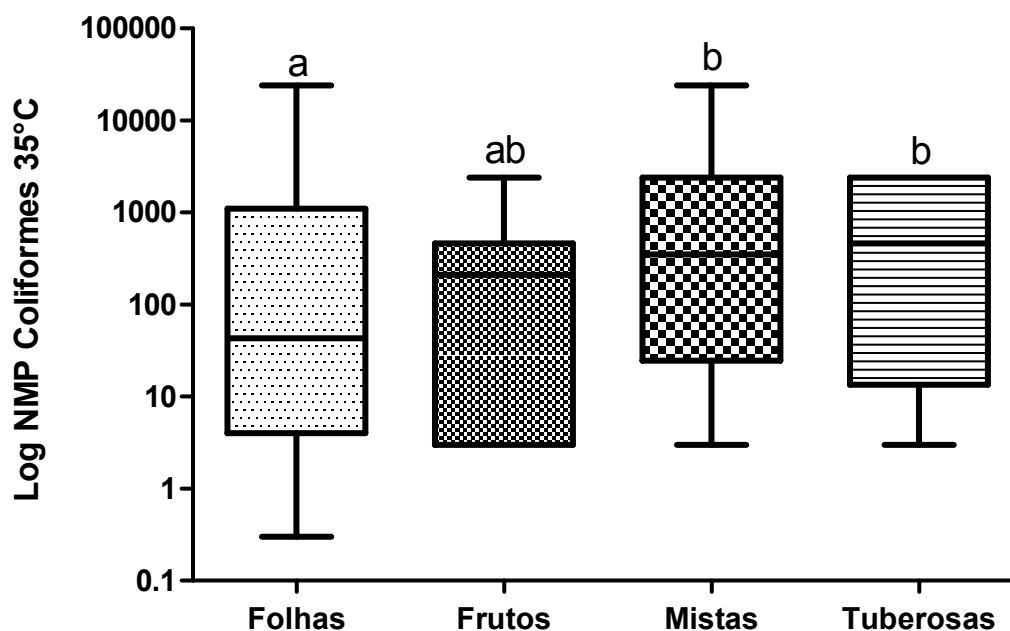
48

Material	N Total	N Pos	% Pos[*]
Tuberosas	34	15	44,12%^a
Mistas	50	9	18,00%^b
Frutos	29	3	10,34%^{BC}
Folhas	528	51	9,66%^c
Total	641	78	12,17%

N Total: Número total de amostras da categoria, N Pos: Número de amostras positivas na categoria, % Pos: Porcentagem de amostras positivas na categoria

* Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 1. Log do NMP de coliformes a 35°C das amostras distribuídas em categorias. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)



Anexo 1 – Normas para publicação no periódico Semina: Ciências Agrárias

Normas editoriais para publicação

Semina: Ciências Agrárias, UEL

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente traduzidos para o inglês.

Os artigos enviados para a revista até esta data e que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

- American Journal Experts
- Editage
- Elsevier
- <http://www.proof-reading-service.com>
- <http://www.academic-editing-services.com/>
- <http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

O autor principal deverá anexar no sistema o documento comprobatório dessa correção na página de submissão em “Docs. Sup.”

OBSERVAÇÕES:

1. Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento cientifi-

co. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(s). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

2. Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).

PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA

- A. A publicação de relatos de casos é restrita e somente serão selecionados para tramitação àqueles de grande relevância ou ineditismo, com real contribuição ao avanço do conhecimento para a área relacionada.

Categorias dos Trabalhos

- A. Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade

de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo título.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: Fonte: IBGE (2014), ou Source: IBGE (2014).

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. Material e Métodos... *Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. Título do trabalho, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3. Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4. Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.

b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.

c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha^{-1} . Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha .

d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L^{-1} , e não g.L^{-1} ou gL^{-1} .

e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem spacejamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes.** A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "Ad hoc" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.

2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.

5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

6. *Numero de autores:* Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte como co-autores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas que tiveram uma pequena participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos, bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO.
3. Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão.

Utilize o botão "incluir autor"

1. No passo seguinte preencher os metadados em inglês.

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "editar metadados" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

A identificação de autoria do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.

Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11;

Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.

2. Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como documento suplementar "Docs. Sup."

Declaração de Direito Autoral

Os Direitos Autorais para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.