

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS  
EM RELAÇÃO AO TEMPO, TEMPERATURA E  
PRODUTOS SANEANTES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Laissa Benites Medeiros**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS EM  
RELAÇÃO AO TEMPO, TEMPERATURA E  
PRODUTOS SANEANTES**

**Laissa Benites Medeiros**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luisa Helena R. Hecktheuer**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Medeiros, Laissa Benites

Avaliação microbiológica de hortaliças em relação ao tempo, temperatura e produtos saneantes. / Laissa Benites Medeiros.-2014.

80 p. ; 30cm

Orientadora: Luisa Helena R. Hecktheuer

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2014

1. Serviços de alimentação 2. Higiene dos alimentos 3. Segurança dos alimentos 4. Métodos de higienização. Hortaliças 5. Contaminação microbiológica I. Hecktheuer, Luisa Helena R. II. Título.

---

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Laissa Benites Medeiros. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: laissa\_medeiros\_1@hotmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS EM RELAÇÃO  
AO TEMPO, TEMPERATURA E PRODUTOS SANEANTES**

Elaborada por  
**Laissa Benites Medeiros**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Luisa Helena R. Hecktheuer, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

---

**Ana Lúcia de Freitas Saccol, Dr<sup>a</sup>.** (UNIFRA)

---

**Neila Silvia P. dos Santos Richards, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

Santa Maria, 29 de Maio de 2014.

Dedico esse trabalho ao meu pai Miguel.  
Foi graças a você que cheguei até aqui,  
com seu apoio e esforço incondicional.  
Obrigada pela vida, por seu amor, respeito e confiança.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e minha protetora Nossa Senhora Medianeira, por me guiar, iluminar e vencer mais uma caminhada da minha vida.

Aos meus pais Miguel e Rocinara que me proporcionaram toda a base para eu chegar até aqui, pela formação e educação e por estarem sempre ao meu lado com apoio, carinho, amor e dedicação.

Ao meu noivo Augusto Baldissera que me apoia, me conforta e me entende. Por seu amor e dedicação nesta etapa da minha vida, compreensão pelas inúmeras vezes em que estive ausente. Obrigada pela paciência e por caminhar comigo até aqui.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Luisa Helena Hecktheuer, pela amizade, compreensão, paciência, confiança e ao tempo a mim dedicado pelas inúmeras vezes em que a solicitei.

As minhas queridas amigas que levarei para sempre no meu coração Lize Stangarlin, Caroline Peixoto, Daiane Cielo e Ana Lúcia Serafim. Vocês foram indispensáveis para que esse trabalho se realizasse. Obrigada pelo carinho, palavras de amizade e por escutarem meus desabafos.

A Ihana Aguiar e a Priscila Weber por toda a ajuda nas análises microbiológicas no laboratório.

A minha colega e companheira de apartamento Raquel Facco por toda ajuda na interpretação dos resultados e na montagem das tabelas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários, por auxiliarem no meu crescimento profissional.

Aos professores participantes da banca examinadora. Obrigada por aceitarem o convite e pelas sugestões nesse trabalho.

Meu profundo agradecimento aos meus colegas, amigos e todos os outros, que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

**MUITO OBRIGADA!!!**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS EM RELAÇÃO AO TEMPO, TEMPERATURA E PRODUTOS SANEANTES**

AUTORA: LAISSA BENITES MEDEIROS

ORIENTADORA: LUISA HELENA R. HECKTHEUER

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 29 de Maio de 2014.

O objetivo desse estudo foi avaliar a microbiota de hortaliças em relação ao tempo, temperatura e produtos saneantes. Foram avaliadas amostras de alface cultivadas convencionalmente, tomate, cenoura e beterraba coletados aleatoriamente em 5 supermercados diferentes no município de Santa Maria, RS. As amostras de alface e tomate foram divididas em 3 tratamentos e codificadas como: alface e tomate com casca *in natura*, sem sanificação (SEM); higienizados com Hipoclorito de Sódio em pó (HIP), e higienizados com Água Sanitária (AS). As amostras de cenoura e a beterraba foram lavadas com água potável, descascadas com cortador e raladas cruas. As amostras foram incubadas em estufa B.O.D em 3 temperaturas diferentes (10°C, 20°C e 30°C), e expostas a essas temperaturas de 1 a 4 horas para cada amostra. Foram coletadas amostras no tempo 0 (T<sub>0</sub>) indicando o nível de contaminação inicial de cada amostra e após 1, 2, 3 e 4 horas de exposição nas temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>). Avaliou-se em cada amostra a contagem total de psicrófilos para a temperatura de 10°C e a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos para as temperaturas de 20°C e 30°C. Avaliou-se ainda a presença de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, pesquisa de *Salmonella* ssp. e a determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Termotolerantes. Os resultados foram expressos em Log UFC/g. As maiores médias na contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos nas amostras de alfaces e tomates foram encontradas nas amostras lavadas com água, independente da temperatura em que foram submetidas. Na contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos nas amostras de tomate as menores médias foram encontradas na temperatura de 10°C. As amostras de cenoura verificam-se as menores médias de contagem foram encontradas na temperatura de exposição de 10°C. Em nenhuma das amostras foram encontradas *Salmonella* ssp, *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes. Conclui-se que independente da temperatura, tempo e método de higienização todas as amostras encontraram-se dentro dos limites aceitáveis exigidos pela legislação vigente, sugerindo que esses alimentos podem ser expostos a uma temperatura maior do que traz as legislações do Brasil.

**Palavras-chave:** Serviços de alimentação. Higiene dos alimentos. Segurança dos alimentos. Métodos de higienização. Contaminação microbiológica. Hortaliças.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Graduate Program on Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria

### **MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF VEGETABLES IN RELATION TIME, TEMPERATURE AND PRODUCT SANITIZING**

AUTHOR: LAISSA BENITES MEDEIROS

ADVISOR: LUISA HELENA R. HECKTHEUER

Date and Place of Defense: Santa Maria, may 29<sup>th</sup>, 2014.

The aim of this study was to evaluate the microbiota of vegetables under different conditions of time and temperature. We evaluated samples of lettuce, tomatoes, carrots and beets randomly collected from supermarkets in Santa Maria (RS). The samples of lettuce and tomatoes were divided in 3 treatments: Lettuce and tomato with skin in natura without sanitizing; cleaned with powder sodium hypochlorite, and sanitary water. We also analyzed peeled samples of carrots and beets washed with potable water only (not sanitize). After the washing and sanitizing procedure was performed, the samples were incubated in 3 different temperatures (10 °C, 20 °C and 30 °C) for 4 hours. Samples were collected at time 0 (To) indicating the initial contamination level of each sample and after 1, 2, 3 and 4 hours of exposure at the temperatures of 10 °C, 20 °C and 30 °C (T1, T2, T3 and T4). In each sample we evaluated the total count of psychrophilic and mesophilic aerobic, presence of Staphylococcus positive coagulase, Salmonella ssp. and the determination of the Most Probable Number of Total and thermotolerant coliforms. The results were expressed as log Log UFC/g. The highest averages in the total count of mesophilic aerobic microorganisms in samples of sanitized lettuce and tomatoes were found in the samples washed with water, apart of the temperature in which they were submitted. In the total count of mesophilic aerobic microorganisms in tomato samples the lowest averages were found at 10 °C. In the samples of beet, we concluded that in the count of mesophilic aerobic, the increase was directly proportional to the exposure time at 30 °C. In the carrot samples we found the lowest averages at 10 °C. In none of the samples were found Salmonella ssp, Staphylococcus positive coagulase and thermotolerant coliforms. We conclude that apart of temperature, time and method of sanitizing all samples were within the acceptable limits required by law, and we highlight that these foods can be exposed to a higher temperature than the laws of Brazil bring, without endangering consumer health.

**Keywords:** Food service. Food hygiene. Food Safe. Methods of cleaning. Microbiological contamination. Vegetables.



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 Objetivo geral .....	11
2.2 Objetivos específicos .....	11
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
3.1 Consumo de Hortaliças no Brasil.....	12
3.2 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) .....	14
3.3 Boas Práticas para Serviços de Alimentação (BPSA) .....	16
3.4 Higienização de hortaliças .....	17
3.5 Temperaturas dos alimentos na etapa de distribuição fria.....	21
<b>4 MANUSCRITO .....</b>	<b>25</b>
4.1 Manuscrito 1 .....	26
<b>AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS EM RELAÇÃO AO TEMPO, TEMPERATURA E PRODUTOS SANEANTES .....</b>	<b>26</b>
Resumo .....	26
Introdução.....	27
Material e Métodos .....	28
Resultados e Discussão .....	30
Conclusão.....	41
Referências.....	42
<b>5. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A –Guide of authors – Periódico Food Control.....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A alimentação é uma das condições básicas para promoção e manutenção da saúde dos indivíduos, desde que a produção e a manipulação dos alimentos se deem dentro de padrões higiênico-sanitários considerados satisfatórios (OLIVEIRA et al., 2003).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) caracterizam-se pela ingestão de alimentos e água contaminados (BUZBY; ROBERTS, 2009). Essas doenças podem ser causadas por uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos que contaminam os alimentos nas diferentes etapas de preparação (HANSON et al., 2012).

É crescente o número de refeições consumidas fora de casa, atualmente, com isso verifica-se a importância que os estabelecimentos alimentícios desempenham neste cenário (STANGARLIN, 2008; OLIVEIRA et al., 2012a; DANELON; SALAY, 2012). De acordo com Jones e Angulo (2006) os serviços de alimentação estão diretamente ligados com o desenvolvimento de DTAs. A temperatura é uma das principais ferramentas no controle do crescimento microbiano nos alimentos e, quando realizada inadequadamente, pode ser um dos causadores da proliferação de micro-organismos (JAY, 2005; ADAMS; MOSS, 2008).

O manejo adequado dos alimentos é importante em todas as etapas da preparação, com objetivo de garantir a estabilidade microbiológica, ofertando um alimento com qualidade e segurança para o consumidor (KIM et al., 2013). As fragilidades mais comuns são a baixa adesão aos procedimentos de higienização, e principalmente, a ausência de monitoramento dos alimentos como temperatura de refrigeração inadequada (EVES; DERVISI, 2005; OSIMANI et al., 2011). A quantidade de patógenos pode aumentar durante a distribuição dos alimentos se a temperatura, em que dos alimentos são submetidos, favorecer o crescimento (ZWIETERING; STEWART; WHITING, 2010).

Vários estudos realizados no Brasil e em outros países, já demonstraram a dificuldade dos serviços de alimentação, em adequar a temperatura dos alimentos frios na etapa de distribuição (MOMESSO; MATTÉ; GERMANO, 2005; MARINO;

SOUZA; RAMOS, 2009; ALVES; UENO, 2010; SEO et al., 2010; CHESCA et al., 2011; MORELLI et al., 2012; POUMEYROL et al., 2012; MEDEIROS et al., 2012; MEDEIROS; SACCOL, 2013).

As legislações sanitárias e normas recomendatórias brasileiras para serviços de alimentos preconizam que os alimentos na etapa de distribuição fria devem permanecer expostos: abaixo de 5°C (BRASIL, 2004a); acima de 5°C e abaixo de 10°C por 2 horas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2008); abaixo de 10°C por 4 horas ou entre 10°C e 21°C por 2 horas (SÃO PAULO, 2011; SÃO PAULO, 2013).

Tendo em vista que os critérios de tempo e temperatura para os alimentos frios na etapa de distribuição, preconizados pelas legislações brasileiras, não estão ocorrendo na prática em serviços de alimentação. Com isso, pretende-se estabelecer se esses alimentos podem permanecer em uma faixa de tempo e temperatura maior do que preconiza a legislação brasileira.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo desse estudo foi avaliar a microbiota de hortaliças utilizadas frequentemente na etapa de distribuição fria em serviços de alimentação submetidas há diferentes tempos, temperaturas e produtos saneantes.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os diferentes produtos de sanificação de hortaliças;
- Comparar o comportamento dos micro-organismos na lavagem com água e com produtos saneantes em hortaliças;
- Verificar a qualidade microbiológica de hortaliças em diferentes critérios de tempo e temperatura de exposição.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Consumo de Hortaliças no Brasil**

Segundo Proença et al. (2005) alimentação é uma das atividades mais importantes do ser humano, tanto por razões biológicas quanto pelas questões sociais e culturais que envolvem o ato de comer. Portanto, alimentar-se engloba vários aspectos que vão desde a produção dos alimentos até a sua transformação em refeições e disponibilização às pessoas (PROENÇA et al., 2005). Diante das mudanças no perfil epidemiológico e do padrão alimentar da população brasileira, destaca-se a necessidade de pôr em prática medidas para a promoção da alimentação saudável (BERNARDON et al., 2009).

Uma alimentação saudável é aquela que fornece água, carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, fibras e minerais, os quais são insubstituíveis e indispensáveis ao bom funcionamento do organismo. A prática de uma dieta balanceada reduz a incidência de transtornos causados pelas deficiências nutricionais, como anemia, desnutrição, obesidade, distúrbios alimentares e também das doenças crônicas não transmissíveis (BRASIL, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças crônicas não transmissíveis são responsáveis por cerca de 60% do total de mortes no mundo e 46% do total de doenças que atinge a população mundial (OPAS, 2003). Estudos em relação à dieta, nutrição e prevenção de doenças crônicas apresentam fortes evidências acerca do papel da alimentação na proteção e controle de morbidades como diabetes, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, entre outras (WHO, 2003).

De acordo com o Ministério da Saúde, de 40 a 90% dos óbitos anuais por doenças crônicas não transmissíveis, de acordo com o tipo de doença, podem ser potencialmente evitados se a população tiver garantido o acesso universal a uma alimentação adequada e saudável, incluindo hortaliças e frutas (BRASIL, 2004b).

Hortaliças são vegetais geralmente cultivados na horta, que compreendem as partes comestíveis das plantas tais como raízes, tubérculos, caules, flores, folhas,

frutos e sementes. São também conhecidas como verduras e legumes (ORNELLAS, 2007).

As hortaliças são classificadas segundo a parte botânica em folhas (acelga, alface, couve, rúcula, espinafre, agrião, repolho, almeirão, mostarda); sementes (ervilhas, feijões verdes, lentilhas, milho verde, soja, amendoim); tubérculos e raízes (beterraba, cenoura, batata, mandioca, cará, nabo); bulbos (alho-poro, alho comum, cebola); flores (brócolis, couve-flor, alcachofra); frutos (abóbora, berinjela, chuchu, pepino, jiló, moranga, pimenta, pimentão, abobrinha, tomate); caules (acelga, aipo, aspargo) e parasitas (cogumelos) (ORNELLAS, 2007).

A produção de hortaliças no Brasil aumentou de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e da Embrapa. No ano 2000 essa produção era de 14.685 mil toneladas, sendo que no ano de 2013 passou para 18.769 mil toneladas, um aumento em 28% de produção (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012).

Estudos demonstram que o consumo de hortaliças é baixo (FARIAS; LOPES, 2004; TORAL et al., 2006; LEAL et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012). Monticelli, Souza e Souza (2013) verificaram em seu estudo que apenas 3,5% dos adolescentes apresentaram consumo adequado tanto de frutas como, especialmente, de hortaliças e legumes.

O baixo consumo de hortaliças, frutas e legumes encontra-se entre os dez principais fatores de risco para doenças em todo o mundo. Aproximadamente 2,7 milhões de óbitos podem ser atribuídos a um baixo consumo de frutas e hortaliças (OPAS, 2003).

Esses alimentos são importantes na composição de uma dieta saudável, pois são fontes de micronutrientes, fibras e de outros componentes com propriedades funcionais (VAN DUYN; PIVONKA, 2000; GOODBURN; WALLACE, 2013). Além disso, esses alimentos possuem baixa densidade energética, isto é, poucas calorias em relação ao volume do alimento consumido, o que favorece a manutenção saudável do peso corporal (ROLLS; ELLO-MARTIN; TOHILL, 2004).

Castro et al. (2008) verificou que cerca de 50% dos participantes de seu estudo que as saladas e legumes crus eram consumidos com a mesma frequência (2 vezes por semana) por apenas 20% e 16,5% deles, respectivamente. Ximenes et al. (2006) verificaram que esse grupo de alimentos é o menos consumido por adolescentes de escolas estaduais e particulares da cidade do Recife (PE).

De acordo com Jaime e Monteiro (2005), menos da metade dos indivíduos no Brasil consome frutas diariamente e menos de um terço da população relata o consumo diário. Neutzling et al. (2009) avaliaram a frequência do consumo de hortaliças na população adulta do Município de Pelotas (RS) e verificaram que está abaixo das recomendações atuais.

A Organização Mundial da Saúde recomenda um consumo mínimo de pelo menos cinco porções diárias de frutas, legumes e hortaliças, o que equivale a 400g ou mais por dia (WHO, 2002). Com isso políticas públicas que estimulem uma alimentação saudável são ainda necessárias.

Assim, a promoção da alimentação saudável é a estratégia fundamental para reversão do atual perfil epidemiológico mundial e prevenção dos agravos nutricionais e de saúde, em todas as faixas etárias, particularmente na infância, quando os hábitos alimentares são formados (OPAS, 2003).

### **3.2 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)**

Segurança alimentar é definida como acesso a alimentação em quantidade e qualidade suficiente ao indivíduo (MARONGWE et al., 2011). No entanto, segurança dos alimentos é empregado quando se refere a alimento seguro ou a inocuidade dos alimentos (WHO, 2011). Alimentos seguros são aqueles que não causam dano à saúde do consumidor, ou seja, apresenta risco aceitável para os consumidores (FORSYTHE, 2010).

As DTAs são caracterizadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por micro-organismos como bactérias, vírus, parasitas, toxinas, prions e também produtos agrotóxicos, químicos e metais pesados (BRASIL, 2004a; BUZBY; ROBERTS, 2009).

Essas doenças afetam milhões de pessoas a cada ano, tanto em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (BEHRENS et al., 2010). Nos Estados Unidos as DTAs são consideradas um importante problema de saúde pública com uma estimativa de 9,4 milhões de doenças e 1.351 mortes por patógenos conhecidos a cada ano (SCALLAN; MAHON, 2012).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorreram, do ano de 2000 a 2013, em torno de 8.848 surtos por DTAs, sendo que em mais de 3.446 surtos o alimento envolvido não foi identificado, logo alimentos mistos foram os principais causadores. Este mesmo dado revela que o agente etiológico foi ignorado nos 4.050 surtos alimentares e a *Salmonella* spp. foi o micro-organismo presente em 1.525 ocorrências (BRASIL, 2013). No Rio Grande do Sul (RS), foram notificados 3.200 surtos de 1998 a 2006, sendo que a maioria deles foi causada por *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* (RIO GRANDE DO SUL, 2008). Oliveira, Brandelli e Tondo (2006), verificaram que no período de 2001 a 2002, dos alimentos envolvidos em surtos ocorridos no RS, 30% envolveram preparações a base de ovos.

Enquanto as hortaliças são claramente consideradas como parte da uma dieta saudável, as DTAs relativas ao consumo desses alimentos são amplamente relatadas (LYNCH; TAUXE; HEDBERG, 2009). Estudos no mundo inteiro ainda relatam surtos envolvendo hortaliças (GELTING et al., 2011; BERALDO; FARACHE FILHO, 2011; MOYNE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; LEVANTESI et al., 2012). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorreram, do ano de 2000 a 2013, 110 surtos envolvendo hortaliças (BRASIL, 2013).

De acordo com Kyle et al. (2010) as hortaliças folhosas ocupam o segundo lugar entre as principais causas das DTAs nos Estados Unidos. Entre 1996 e 2004, o *Food Drug e Administration* (FDA) verificou que dos 859 casos de surtos de DTAs notificados, 14 foram causados por alimentos frescos, sendo que alfaces e tomates foram confirmados como fonte (SMITH; DE WALL; BHUIZA, 2009).

O aparecimento das doenças, muitas vezes está associado ao consumo de alimentos nos serviços de alimentação (HAAPALA; PROBART, 2004; GURUDASANI; SHETH, 2009). Segundo Rodrigues e Salay (2012), esses estabelecimentos devem fornecer produtos e/ou preparações de qualidade para os consumidores.

Ainda essas doenças podem ser ocasionadas pelas condições sanitárias inadequadas nos serviços de alimentação, com destaque, ao baixo nível de conhecimento sobre Boas Práticas (SOUZA; SILVA, 2004). Nesse contexto, os serviços de alimentação devem adotar programas de qualidade que têm o objetivo de prevenir surtos alimentares (FAUSTINO et al., 2007).



Em nível internacional, recentemente utilizado no Brasil, o método de Análise de Riscos, vem sendo aplicado para reduzir os níveis de DTAs e melhorar os sistemas de segurança dos alimentos tanto para indústrias quanto para serviços de alimentação (TONDO; BARTZ, 2012).

A análise de riscos é composta de três componentes: gerenciamento de riscos; avaliação de riscos e comunicação de riscos. Esse método é sistemático e altamente estruturado que avalia possíveis perigos e riscos presentes nos alimentos e pode estabelecer ou não medidas de controle por isso é muito utilizado para reduzir os níveis de DTAs (FAO/WHO, 2006; TONDO; BARTZ, 2012).

### **3.3 Boas Práticas para Serviços de Alimentação (BPSA)**

Serviço de alimentação é o estabelecimento onde o alimento é manipulado, preparado, armazenado e/ou exposto à venda, podendo ser ou não ser consumido no local (SILVA JR., 2012). Esses estabelecimentos devem realizar rigorosas práticas higiênicas no preparo dos alimentos, sendo essenciais para garantir a produção de um alimento seguro (CHOUMAN; PONSANO; MICHELIN, 2010). No Brasil e em muitos países, uma das principais ferramentas para proporcionar a segurança dos alimentos são as Boas Práticas (TONDO; BARTZ, 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou no ano de 2004, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 216 que regulamenta as BPSA no Brasil (BRASIL, 2004a). As BPSA são procedimentos necessários para o controle higiênico-sanitário dos alimentos e representa uma das principais ferramentas de qualidade, sendo que a implementação garante este controle (GERMANO, et al., 2000; MARTINS; HOGG; OTERO, 2011; STANGARLIN et al., 2013).

Os itens que compõe as BPSA são edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios; higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios; controle integrado de vetores e pragas urbanas; abastecimento de água; manejo dos resíduos; manipuladores; matérias-primas, ingredientes e embalagens; preparação do alimento; armazenamento e transporte do alimento preparado; exposição ao consumo do alimento preparado; documentação e registro e responsabilidade (BRASIL, 2004a).

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) criou em 2008 a Norma Brasileira (NBR) nº 15635, exclusiva para serviços de alimentação. Esta Norma é baseada na RDC nº 216/2004 e aplica-se a cantinas, bufês, lanchonetes, padarias, pastelarias, bares, restaurantes, rotisseries, comissárias, confeitarias, delicatessens, cozinhas industriais, institucionais, hospitalares e escolares. Essa especifica os requisitos de BPSA e dos controles operacionais essenciais a serem seguidos para que esses estabelecimentos possam comprovar que produzem alimentos em condições higiênico-sanitárias adequadas para o consumo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2008).

Ainda contemplando as BPSA, a Secretaria da Saúde do Estado do RS, complementa tal resolução com a portaria nº 78, publicada no Diário Oficial em 30 de janeiro de 2009. Esta portaria dispõe de alguns requisitos não especificados na legislação federal (BRASIL, 2004a; RIO GRANDE DO SUL, 2009). O estado e o município de São Paulo também dispõem de legislações específicas que regulamentam as BPSA, sendo elas a Portaria CVS nº 5 e a Portaria nº 2619, respectivamente (SÃO PAULO, 2011; SÃO PAULO, 2013).

Estudos demonstram o baixo nível de adequação dos estabelecimentos quanto aos requisitos exigidos pela legislação brasileira, evidenciando assim a falta de comprometimento e a dificuldade das empresas na implementação dessas ferramentas (AKUTSU et al., 2005; SACCOL et al, 2009; RODRIGUES; SALAY, 2012; MEDEIROS et al., 2012). Medeiros et al. (2012) avaliaram as condições higiênico-sanitárias de serviços de alimentação da cidade de Santa Maria (RS) de acordo com a NBR 15635:2008 e verificaram que somente um estabelecimento foi classificado como Bom. Alguns itens irregulares ressaltados nestes estudos estão relacionados à preparação dos alimentos, principalmente a higienização inadequada de hortaliças e a temperaturas de manutenção e distribuição.

### **3.4 Higienização de hortaliças**

Por serem muito manipuladas, as hortaliças podem ter sua microbiota aumentada, alterada e, eventualmente, veicularem micro-organismos patogênicos ocasionando as DTAs. A microbiota natural das hortaliças é variável, e em geral é

constituída por espécies de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, bactérias coliformes e lácticas que podem causar deterioração nesses alimentos (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

A higienização desempenha importante papel na qualidade dos alimentos, diminuindo o número de micro-organismos (CASTRO, 2013). Assim, é necessário avaliar os procedimentos de higienização e o tempo e temperatura que estes alimentos são submetidos, com intuito de evitar os riscos microbiológicos durante toda a cadeia produtiva (ABADIAS et al., 2006; ISSA-ZACHARIA et al., 2011; DING et al. 2013).

Com isso aumenta-se a preocupação com a saúde, principalmente, em relação aos micro-organismos patogênicos, que contribuem para o aumento do número de DTAs causadas por *Salmonella* e *Escherichia coli* O157:H7 (ROSA; MARTINS; FOLLY, 2007; STOPFORTH et al., 2008 TAUXE et al., 2010). Isso reforça a importância da higienização desses alimentos para evitar a contaminação, no qual pode ocorrer após a lavagem ou sanificação e na etapa de distribuição (OLIVEIRA et al., 2010). De acordo com Beuchat (2002) e Gupta, Khan e Santra (2009) a contaminação de hortaliças está relacionada principalmente com a ausência de procedimentos adequados de higienização em serviços de alimentação.

De acordo com a Portaria nº 78/2009, a realização de um procedimento correto de higienização deve seguir as etapas: I. Seleção dos alimentos, retirando partes ou produtos deteriorados e sem condições adequadas; II. Lavagem criteriosa dos alimentos um a um, com água potável; III. Desinfecção, com imersão em solução clorada com 100 a 250ppm de cloro livre, por 15 minutos, ou outros produtos adequados e IV. Enxágue com água potável (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

Segundo a Anvisa os produtos saneantes devem ser registrados no Ministério da Saúde, devem ser liberados para esse fim e sua diluição, tempo de contato e modo de uso/aplicação devem obedecer às instruções recomendadas pelo fabricante (BRASIL, 2004a; RIO GRANDE DO SUL, 2009). De acordo com a RDC nº 55 de 2009, podem ser utilizados em estabelecimentos alimentícios, produtos saneantes categorizados como água sanitária e alvejantes à base de hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio (BRASIL, 2009).

Segundo a RDC nº 55, água sanitária é definida como uma solução aquosa com a finalidade de desinfecção e alvejamento, cujo ativo é o hipoclorito de sódio ou

de cálcio, com teor de cloro ativo entre 2,0 e 2,5% p/p, podendo conter componentes complementares como hidróxido de sódio ou de cálcio, cloreto de sódio ou de cálcio e carbonato de sódio ou de cálcio. Já alvejantes à base de hipoclorito é definido como solução aquosa com a finalidade de alvejamento e/ou desinfecção, cujo ativo é o hipoclorito de sódio ou de cálcio, com teor de cloro ativo entre 2,0 e 2,5% p/p, podendo conter estabilizantes, corantes, fragrâncias, sequestrantes e/ou tensoativos em sua formulação (BRASIL, 2009).

Em muitos casos as diluições não são realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, o que pode contribuir ainda mais para um resultado insatisfatório na higienização. Silva Júnior (2012) complementa que essa deve ser realizada de forma que o processo bactericida não se torne suicida, ou seja, os produtos de higienização devem ser utilizados em diluição adequada para que não se tornem tóxicos ao organismo humano. De acordo com a Portaria nº 78/2009 a diluição em solução clorada deve ter de 100 a 250ppm de cloro livre, durante 15 minutos de imersão (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

Existe atualmente uma ampla variedade de sanificantes que podem ser utilizados na higienização dos alimentos (YANG; FEIRTAG; DIEZ-GONZALEZ, 2013). Porém, a eficácia desses produtos deve ser avaliada com o objetivo de garantir a eliminação das bactérias patogênicas nos alimentos (ORUE et al., 2013).

Nos estabelecimentos alimentícios, os produtos a base de cloro são os sanificantes mais comuns utilizados para os alimentos e para a prevenção de contaminação cruzada (STOPFORTH et al., 2008; ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009; NOU et al., 2011; WATERS; HUNG, 2013; FERNANDES et al., 2014). O hipoclorito de sódio é um eficiente sanificante para eliminar vários micro-organismos patogênicos como, por exemplo, a *Listeria monocytogenes* (ANTONIOLLI et al., 2005; NIEUWENHUIJSEN, 2005).

Segundo estudo de Nascimento et al. (2002), o hipoclorito teve melhor resultado como sanitizante em hortaliças folhosas, sendo que em 10 minutos houve uma redução do número de coliformes totais e termotolerantes. Fontana (2006) recomenda que 15 minutos em soluções com hipoclorito a 50 a 200 ppm são suficientes para eliminação desses micro-organismos indicadores.

De acordo com estudo realizado em Pelotas (RS), no qual avaliou-se a eficácia da higienização na redução de coliformes totais e termotolerantes em hortaliças folhosas, verificou-se que o melhor resultado foi o hipoclorito de sódio, em

comparação com a lavagem apenas com água potável (SANTOS et al., 2004). Os produtos clorados na diluição de uma colher de sopa por um litro de água (200 ppm) é considerado seguro para a sanitização dos alimentos (BOURQUIN, 2008; MCGLYNN, 2010).

O uso de produtos a base de cloro são proibidos na higienização dos alimentos, em vários países europeus, tais como Alemanha, Holanda, Dinamarca e Bélgica (RICO et al., 2007; ARTES et al., 2009; PÉREZ-GREGORIO et al., 2011), pois apresenta risco de formação de compostos indesejáveis. Artes et al. (2009) afirmam produtos a base de cloro pode reagir com substâncias naturais, normalmente presentes na água para formar compostos como trihalometanos (THI). Os THI desencadeiam a produção de radicais livres no organismo, são altamente cancerígenos, e causam danos celulares como toxicidade ao fígado e rins (NIEUWENHUIJSEN; TOLEDANO; ELLIOT, 2000). Com isso, os alimentos somente podem ser lavados com água potável corrente para minimizar a contaminação dos alimentos nesses países (SELMA et al., 2008; OLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009).

A lavagem de hortaliças folhosas em água corrente potável pode reduzir em até 90% a carga microbiana (BEUCHAT et al., 2001), desde que essa esteja em condições adequadas (GERBA, 2009; GIL et al., 2009; HOLVOET et al., 2012). Em estudo Allende et al. (2008) verificou-se que a qualidade água impacta na eficácia da redução de micro-organismos nos alimentos.

Gil et al. (2009) afirma que a qualidade da água é um fator muito importante, uma vez que poderá servir como uma fonte de contaminação cruzada. Dessa forma, o uso da água potável e em condições adequadas para o consumo como um produto sanitizante no Brasil deve ser avaliado (LÓPEZ-GÁLVEZ et al., 2010; VAN HAUTE et al., 2013).

O uso de sanificantes nas etapas de higienização dos alimentos é indicado, pelos estudos, como um produto eficiente na redução da carga microbiana (ZHANG et al., 2009; HOLVOET et al., 2014). Em estudo Zhang et al. (2009) verificaram a redução de contaminação por *Escherichia coli* O157:H7 após a desinfecção de amostras de alfaces utilizando hipoclorito de sódio.

### 3.5 Temperaturas dos alimentos na etapa de distribuição fria

O manejo adequado dos alimentos é importante em todas as etapas da preparação, principalmente no momento da distribuição, com objetivo de garantir a estabilidade microbiológica, ofertando um alimento seguro ao consumidor (KIM et al., 2013). A contagem de micro-organismos dos alimentos pode aumentar durante a distribuição, se submetidos a temperaturas que favoreçam este crescimento (ZWIETERING; STEWART; WHITING, 2010).

As legislações e normas recomendatórias brasileiras para serviços de alimentação preconizam critérios de tempo e temperatura na etapa de distribuição dos alimentos frios como demonstrado no Quadro 1.

Legislações e Normas recomendatórias brasileiras	Tempo e Temperatura dos alimentos na etapa de distribuição	Referências
RDC nº 216/2004 (Âmbito Federal)	↓5°C	BRASIL (2004a)
Portaria nº 78/2009 (Somente Rio Grande do Sul)	↓5°C Vegetais folhosos crus, higienizados e não adicionados de molho e prontos para o consumo - temperatura ambiente por no máximo 1 hora	RIO GRANDE DO SUL (2009)
CVS nº 5/2013 (Somente São Paulo)	Até 10°C por 4 horas 10°C e 21°C por 2 horas	SÃO PAULO (2013)
Portaria nº 2619/2011 (Somente município de São Paulo)	Até 10°C por 4 horas 10°C e 21°C por 2 horas	SÃO PAULO (2011)
NBR 15635:2008 (Não Obrigatória)	↑ 5°C e ↓10°C por 2 horas	ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (2008)

Quadro 1 – Critérios de tempo e temperatura na etapa de distribuição dos alimentos frios para serviços de alimentação de acordo com as legislações e norma recomendatória vigentes no Brasil, 2014.

As temperaturas dos alimentos demonstradas no Quadro 1, já foram avaliadas em diversos estudos no Brasil, e todos verificaram irregularidades na

manutenção dos alimentos na etapa de distribuição. Medeiros et al. (2012) constataram que a temperatura dos alimentos frios, em todos os estabelecimentos da cidade de Santa Maria (RS) encontravam-se em desacordo, e algumas dessas preparações, como as saladas, estavam expostas a temperatura ambiente em 48% (n=11) dos locais durante duas horas.

Em estudo que avaliou as temperaturas dos alimentos frios em unidades de alimentação e nutrição da cidade de Caxias do Sul (RS) verificaram que todas estavam inadequadas (média de 20°C durante 2 horas) com o que preconiza a legislação brasileira (MEDEIROS; SACCOL, 2013).

Chesca et al. (2011) avaliaram a temperatura das saladas nas refeições transportadas de Uberaba e verificaram que todas encontravam-se erradas, com média de 24°C. Marinho, Souza e Ramos (2009) verificaram que somente 8,6% das saladas frias estavam dentro das temperaturas recomendadas pela legislação. Alves e Ueno (2010) avaliaram a temperatura dos alimentos servidos nos balcões de distribuição em restaurantes de Taubaté (SP) e verificaram que de todos os alimentos frios, apenas um estava em adequado.

Em estudo Ri et al. (2011), verificaram que os alimentos que mais encontraram-se fora da temperatura adequada foram às hortaliças que de 73 amostras avaliadas, apenas 4 encontravam-se abaixo de 10°C, tendo apenas 5% de conformidade. Esse dado corrobora com o estudo realizado por Ventimiglia e Basso (2008), no qual observaram que as hortaliças servidas em restaurantes encontravam-se no balcão de distribuição em temperatura acima de 21°C.

Com os resultados dos estudos, verificam-se que os serviços de alimentação tem dificuldade de adequar às temperaturas dos alimentos frios com os critérios estabelecidos pelas legislações e normas recomendatórias brasileiras. Em estudos que avaliaram o controle de temperatura em outros países os resultados encontrados não são diferentes.

Poumeyrol et al. (2012) compararam as temperaturas dos alimentos frios com os padrões exigidos pela legislação dos Estados Unidos. Estes autores verificaram que as temperaturas são maiores do que o valor exigidos (5°C), ou seja, a média encontrada foi de 26°C no centro geométrico do alimento. Morelli et al. (2012) avaliaram temperaturas dos alimentos refrigerados expostos à venda de padarias de Paris e verificaram que 68% das temperaturas estavam insatisfatórias (acima de 7°C).

Segundo a Associação Nacional de Restaurantes da Coréia os alimentos frios devem ser mantidos a uma temperatura inferior a 5°C, sendo que no estudo Seo et al. (2010) verificaram que a salada de broto de soja encontrava-se a uma temperatura inicial de 15,2°C e depois de 3 horas em 13,2°C.

No Quadro 2 encontram-se alguns dos critérios de temperaturas na etapa de distribuição dos alimentos frios preconizados por algumas legislações de diferentes países.

<b>Legislações</b>	<b>Temperatura dos alimentos na etapa de distribuição</b>	<b>Referências</b>
Austrália	↓5°C por 4 horas	SAFE FOOD AUSTRALIA. A Guide to the Food Safety Standards. Australian, 2nd Edition, January 2001.
Estados Unidos	5°C por 4 horas	U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food Code. United States, 2009.
Inglaterra	↓8°C por 2 horas	STATUTORY INSTRUMENTS. The food hygiene regulations. England, n.14, 2006.
País de Gales	↓8°C por 2 horas	STATUTORY INSTRUMENTS. The food hygiene regulations. Wales, n.31, 2006.
Irlanda do Norte	↓8°C por 2 horas	STATUTORY RULES OF NORTHERN IRELAND. The food hygiene regulations. Northern Irland, n.3, 2006.
Escócia	↓8°C por 2 horas	SCOTTISH STATUTORY INSTRUMENTS. The food hygiene regulations. Scotland, n.3, 2006.

Quadro 2 – Critérios de temperatura na etapa de distribuição dos alimentos frios para serviços de alimentação de acordo com algumas legislações de outros países, 2014.

Neste contexto, os estudos demonstram deficiências na implementação dos procedimentos que envolvem a segurança dos alimentos em serviços de alimentação. As fragilidades mais comuns são a deficiência nas etapas de higienização, e principalmente, a falta de atividade de monitoramento dos alimentos como aquecimento inadequado e práticas inseguras de refrigeração (EVES; DERVISI, 2005; OSIMANI et al., 2011).



Taylor (2001) salienta que as atividades de verificação para a segurança dos alimentos são comumente baseadas nos hábitos, ao invés de serem baseadas em prática e em evidências que muitas vezes não são levadas em consideração. Inúmeras medidas de controle podem ser aplicadas no preparo dos alimentos, com base no monitoramento de temperatura de distribuição com objetivo de evitar a proliferação dos micro-organismos (COMMEAU; JALOUSTRE, 2013).

Nos alimentos a necessidade de determinar o controle de tempo e temperatura depende da natureza do produto, devido às interações complexas dos componentes dos alimentos. Os estudos são um desafio frequente que deve ser realizado para determinar se o alimento requer tempo e temperatura que comprove a sua segurança (ANÔNIMO, 2003). Assim, estas medidas de controle ou recomendações devem ser validadas, isto é, existe uma necessidade de proporcionar evidência para que sejam eficazes e aplicáveis (JALOUSTRE et al., 2012).

**4 MANUSCRITO**

## 4.1 Manuscrito 1

Artigo em revisão final pelos autores para submissão ao periódico Food Control  
Estruturação conforme respectiva Instrução para os autores, Anexo A

### **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS EM RELAÇÃO AO TEMPO, TEMPERATURA E PRODUTOS SANEANTES**

**Resumo:** O objetivo desse estudo foi avaliar a microbiota de hortaliças em relação ao tempo, temperatura e produtos saneantes. Foram avaliadas amostras de alface, tomate, cenoura e beterraba, todos cultivados convencionalmente coletados aleatoriamente em 5 supermercados diferentes no município de Santa Maria, RS. As amostras de alface e tomate foram divididas em 3 tratamentos e codificadas como: alface e tomate com casca *in natura*, sem sanificação (SEM); higienizados com Hipoclorito de Sódio em pó (HIP), e higienizados com Água Sanitária (AS). As amostras de cenoura e a beterraba foram lavadas com água potável, descascadas com cortador e raladas cruas. Após, as amostras foram incubadas em estufa B.O.D em 3 temperaturas diferentes (10°C, 20°C e 30°C), e expostas a essas temperaturas de 1 a 4 horas para cada amostra. Foram coletadas amostras no tempo 0 (T<sub>0</sub>) indicando o nível de contaminação inicial de cada amostra e após 1, 2, 3 e 4 horas de exposição nas temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>). Avaliou-se em cada amostra a contagem total de psicrófilos para a temperatura de 10°C e a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos para as temperaturas de 20°C e 30°C. Avaliou-se ainda a presença de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, pesquisa de *Salmonella* ssp. e a determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Termotolerantes. Os resultados foram expressos em Log UFC/g. As maiores médias na contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos nas hortaliças foram constatadas nas amostras de alface e tomate lavadas com água, independente da temperatura em que foram submetidas. Em nenhuma das amostras foram encontradas *Salmonella* ssp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes. Conclui-se que nas temperaturas avaliadas, todas as amostras encontraram-se dentro dos limites aceitáveis exigidos pela legislação vigente, sugerindo que as hortaliças podem ser expostas a uma temperatura ambiente pelo tempo de 4 horas.

35 **Palavras-chave:** Serviços de Alimentação; Higiene dos Alimentos; Segurança dos  
36 alimentos; Métodos de higienização; Contaminação microbiológica.

37

## 38 **1. Introdução**

39

40 De acordo com Oliveira, Brandelli e Tondo (2003), a alimentação é uma das  
41 condições básicas para promoção e manutenção da saúde, desde que a produção e  
42 a manipulação dos alimentos estejam dentro de padrões higiênico-sanitários  
43 considerados satisfatórios. A ingestão de alimentos ou água contaminados por  
44 micro-organismos caracterizam as doenças transmitidas pelos alimentos (Buzby &  
45 Roberts, 2009).

46 De acordo com os dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde,  
47 as doenças transmitidas pelos alimentos afetam milhões de pessoas a cada ano em  
48 países desenvolvidos e subdesenvolvidos (Behrens et al., 2010). Scallan e Mahon  
49 (2012) afirmam que nos Estados Unidos essas doenças são consideradas um  
50 importante problema de saúde pública com uma estimativa de 9,4 milhões de  
51 doenças e 1.351 mortes por patógenos conhecidos a cada ano.

52 No Brasil, ocorreram, do ano de 2000 a 2013, em torno de 8.848 surtos,  
53 sendo que em mais de 3.446 surtos o alimento envolvido não foi identificado; a  
54 *Salmonella* spp. foi o micro-organismo presente em 1.525 ocorrências, e 110 surtos  
55 envolveram hortaliças (Brasil, 2013).

56 O aparecimento das doenças, muitas vezes está associado ao consumo de  
57 alimentos nos serviços de alimentação (Walker, Pritchard, & Forsythe, 2003;  
58 Haapala & Probart, 2004; Gurudasani & Sheth, 2009). Segundo Rodrigues e Salay  
59 (2012), os serviços de alimentação devem fornecer preparações de qualidade para  
60 os consumidores, não colocando em risco sua saúde.

61 A Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou no ano de 2004, a  
62 Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 216 que regulamenta as boas práticas  
63 para serviços de alimentação (Brasil, 2004). As boas práticas representa uma das  
64 principais ferramentas de qualidade, sendo procedimentos necessários para o  
65 controle higiênico-sanitário dos alimentos (Germano, et al., 2000; Martins, Hogg, &  
66 Otero, 2011; Stangarlin, Hecktheuer, Serafim, & Saccol, 2013).

67 Estudos demonstram o baixo nível de adequação dos estabelecimentos  
68 quanto aos requisitos exigidos pela legislação brasileira, evidenciando a dificuldade

69 das empresas na implementação dessas ferramentas (Akutsu, Botelho, Camargo,  
70 Sávio, & Araújo, 2005; Saccol, Stangarlin, Richards, & Hecktheuer, 2009; Rodrigues  
71 & Salay, 2012; Medeiros, Saccol, Delevati, & Brasil, 2012). Alguns itens de  
72 irregularidades ressaltados nesses estudos estão relacionados à preparação dos  
73 alimentos, principalmente a higienização inadequada e a temperaturas de  
74 manutenção e distribuição.

75 De acordo com a RDC nº 216 os alimentos na etapa de distribuição devem  
76 ficar abaixo de 5°C (Brasil, 2004). Estudos realizados no Brasil e em outros países,  
77 já demonstraram a dificuldade dos serviços de alimentação, em adequar a  
78 temperatura dos alimentos (Momesso, Matté, & Germano, 2005; Marino, Souza, &  
79 Ramos, 2009; Alves & Ueno, 2010; Seo, Seo, Cha, & Oh, 2010; Chesca,  
80 Bataglioni, Faria, Andrade, Silveira, & D'Angelis, 2011; Morelli, Noel, Rosset, &  
81 Poumeyrol, 2012; Poumeyrol, Morelli, Noel, & Cornu, 2012; Medeiros, Saccol,  
82 Delevati, & Brasil, 2012; Medeiros & Saccol, 2013).

83 A higienização é de extrema importância na qualidade dos alimentos, pois  
84 diminui o número de micro-organismos (Castro, 2013). Assim, torna-se necessário  
85 avaliar os produtos utilizados na higienização, o tempo e a temperatura que esses  
86 alimentos são submetidos, para evitar sua contaminação durante sua produção  
87 (Ding et al., 2013). Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a microbiota de  
88 hortaliças em relação ao tempo, temperatura e produtos saneantes.

89

## 90 **2. Material e Métodos**

91

### 92 **2.1 Amostras**

93 Foram avaliadas amostras de alface (*Lactuca sativa* L.), tomate  
94 (*Lycopersicon esculentum*), cenoura (*Daucus carota* L.) e beterraba (*Beta vulgaris*  
95 *esculenta*) cultivados convencionalmente, coletados aleatoriamente em 5  
96 supermercados diferentes no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil,  
97 no período de abril a novembro de 2013.

98 As amostras de alface e tomate foram divididas em 3 tratamentos e  
99 codificadas como: alface e tomate com casca *in natura*, sem sanificação (SEM);  
100 higienizados com Hipoclorito de Sódio em pó (HIP), e higienizados com Água  
101 Sanitária (AS), contendo hipoclorito de sódio, cloreto de sódio e água. O último

102 tratamento avaliado foi considerado para verificar o comportamento microbiano  
103 utilizando os dois produtos mais usuais.

104 As amostras de alface e tomate foram higienizadas conforme os requisitos  
105 exigidos pela Portaria nº 78, contemplando as seguintes etapas: 1) selecionaram-se  
106 os alimentos, retirando partes deterioradas e sem condições adequadas; 2) lavagem  
107 criteriosa dos alimentos um a um, com água potável corrente; 3) imersão no produto,  
108 por 15 minutos, sendo este adequado para este fim e com registro no Ministério da  
109 Saúde e diluído de acordo com as indicações do fabricante, com concentração de  
110 200 ppm; 4) Após 15 minutos, os alimentos foram lavados com água potável para  
111 retirar os resíduos do produto (Rio Grande do Sul, 2009).

112 As amostras de cenoura e a beterraba foram lavadas com água potável,  
113 descascadas com cortador e raladas cruas tendo em vista que é dessa maneira que  
114 são mais comumente consumidas em serviços de alimentação.

115

## 116 2.2 Análises Microbiológicas

117 As amostras foram incubadas em estufa B.O.D em 3 temperaturas diferentes,  
118 ou seja, 10°C, 20°C e 30°C, e expostas a essas temperaturas de 1 a 4 horas para  
119 cada amostra. As amostras utilizadas nas temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C foram  
120 de lotes diferentes.

121 As amostras de alface foram incubadas inteiras (sem cortes), o tomate picado  
122 em cubos, e a cenoura e beterraba raladas cruas. Foram coletadas 25 gramas de  
123 cada amostra em sacos plásticos estéreis com 225 mL de solução peptonada  
124 tamponada a 0,1%. Foram coletadas amostras no tempo 0 (To) indicando o nível de  
125 contaminação inicial de cada amostra e após 1, 2, 3 e 4 horas de exposição nas  
126 temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C (T1, T2, T3 e T4).

127 Avaliou-se em cada amostra a contagem total de psicrófilos para a  
128 temperatura de 10°C e a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos  
129 para as temperaturas de 20°C e 30°C. Avaliou-se ainda a presença de  
130 *Staphylococcus* Coagulase Positiva, pesquisa de *Salmonella* ssp. e a determinação  
131 do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Termotolerantes (Brasil,  
132 2003).

133 As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do  
134 Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de  
135 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, conforme a Instrução Normativa nº 62

136 (Brasil, 2003). Os resultados foram expressos em Log Unidade Formadora de  
 137 Colônia - UFC/g e comparados com os padrões microbiológicos estabelecidos pela  
 138 RDC nº 12 (Brasil, 2001).

139

### 140 2.3 Análise estatística

141 Os resultados obtidos foram avaliados no *software Statistical Package for the*  
 142 *Social Sciences* (SPSS), versão 19.0. Os dados foram analisados através de  
 143 estatística descritiva simples (média  $\pm$  desvio padrão).

144

## 145 3. Resultados e Discussão

146

147 Na Tabela 1, estão demonstradas as contagens totais de psicrófilos (Log  
 148 UFC/g) nas amostras de alface e tomate submetidas à temperatura de 10°C.  
 149 Verifica-se que as maiores médias, foram constatadas nas amostras lavadas apenas  
 150 com água em ambas as hortaliças.

151

152 **Tabela 1** – Contagem total de psicrófilos (Log UFC/g) em amostras de alfaces e  
 153 tomates submetidas à temperatura de 10°C e a diferentes métodos de sanificação,  
 154 Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

	ALFACE			TOMATE		
	SEM	HIP	AS	SEM	HIP	AS
	Med. $\pm$ DP	Med. $\pm$ DP	Med. $\pm$ DP	Med. $\pm$ DP	Med. $\pm$ DP	Med. $\pm$ DP
<b>T0</b>	4.25 $\pm$ 0.18	2.46 $\pm$ 0.20	2.80 $\pm$ 0.07	3.63 $\pm$ 0.45	2.48 $\pm$ 2.85	3.24 $\pm$ 0.34
<b>T1</b>	4.32 $\pm$ 0.58	2.57 $\pm$ 0.08	2.77 $\pm$ 0.29	4.60 $\pm$ 0.46	2.39 $\pm$ 0.30	3.34 $\pm$ 0.84
<b>T2</b>	4.44 $\pm$ 0.56	2.79 $\pm$ 0.16	2.78 $\pm$ 0.09	5.63 $\pm$ 0.80	3.06 $\pm$ 0.47	3.40 $\pm$ 0.16
<b>T3</b>	4.48 $\pm$ 0.59	2.82 $\pm$ 0.17	2.98 $\pm$ 0.53	5.60 $\pm$ 0.46	3.11 $\pm$ 0.78	3.78 $\pm$ 0.43
<b>T4</b>	4.77 $\pm$ 0.74	2.81 $\pm$ 0.16	3.22 $\pm$ 0.53	6.97 $\pm$ 0.72	3.20 $\pm$ 0.46	4.30 $\pm$ 0.47

155 HIP: Hipoclorito de Sódio; AS: Água Sanitária; SEM: Sem higienizar

156

157

158 Velázquez, Barbini, Escudero, Estrada, e Guzmán (2009) avaliaram a  
 159 contagem total de micro-organismos mesófilos em alfaces *in natura* e verificaram  
 160 valores mais altos (7,30 $\pm$ 0.25) quando comparados com os resultados do presente  
 161 estudo no qual as amostras não higienizadas obtiveram as maiores contagens  
 162 desses micro-organismos.

163 A RDC nº 12 da Anvisa não prevê limites para a contagem de micro-  
164 organismos aeróbios mesófilos para hortaliças frescas *in natura* (Brasil, 2001), mas  
165 sabe-se que esses são utilizados como indicadores para avaliar a qualidade  
166 sanitária dos alimentos (Jay, 2005; Matsubara et al., 2011; Silva Jr., 2012).

167 Dartora (2013) que avaliou amostras de tomate submetidas a diferentes  
168 métodos de higienização e verificou que as amostras que não foram higienizadas  
169 obtiveram os maiores valores de contaminação por micro-organismos aeróbios  
170 mesófilos (8.25 log UFC/g) corroborando com o presente estudo. Esses resultados  
171 reforçam a importância da utilização de sanitizantes na higienização de hortaliças,  
172 demonstrando que a realização dessa etapa é fundamental para a diminuição da  
173 carga microbiana nos alimentos.

174 Quando comparado o método de sanificação com hipoclorito de sódio em pó  
175 em relação à temperatura de exposição a 10°C, constata-se que esse tratamento foi  
176 o mais eficiente, mantendo a carga microbiana do alimento em níveis mais baixos  
177 quando comparado aos demais tratamentos na mesma temperatura, tanto para as  
178 amostras de alface quanto para as amostras de tomate (tabela 1).

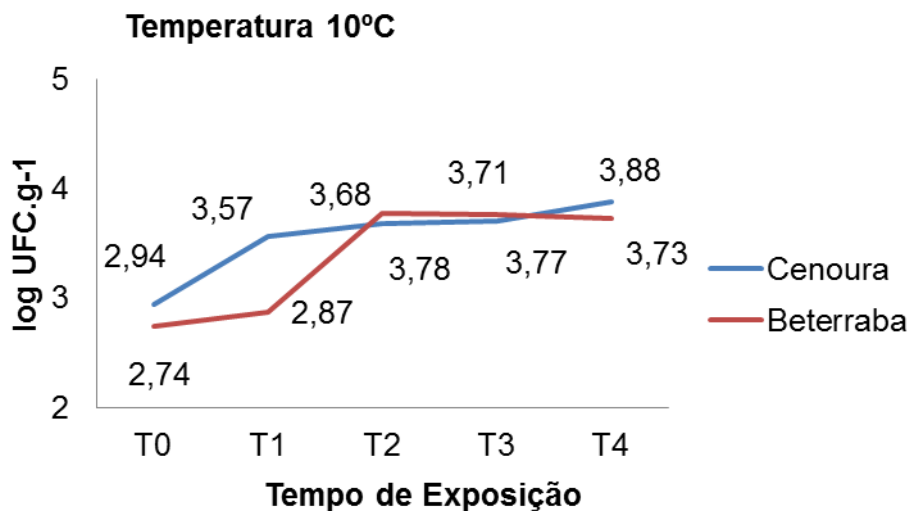
179 Verifica-se também na tabela 1, que após 2 horas de exposição das amostras  
180 de alface, a contagem de micro-organismos psicrófilos aumentaram ( $T_0 = 2,46 \pm 0.20$   
181 e  $T_1 = 2.57 \pm 0.08$ ). Isso evidencia que sua exposição após esse tempo nessa  
182 temperatura com as amostras higienizadas com hipoclorito, pode aumentar a carga  
183 microbiana dos alimentos, como verificado no presente estudo nas amostras de  
184 alface.

185 De acordo com a CVS nº 5, do estado de São Paulo, os alimentos na  
186 distribuição podem ficar expostos a uma temperatura de 10°C a 20°C por no máximo  
187 duas horas (São Paulo, 2013). Em estudo Medeiros, Saccol, Delevati, e Brasil  
188 (2012) verificaram que as temperaturas dos alimentos frios, em serviços de  
189 alimentação, encontravam-se em desacordo, sendo que as saladas ficavam  
190 expostas a temperatura ambiente (18°C a 25°C) em 48% dos locais.

191 Na figura 1 está demonstrada a contagem total de micro-organismos aeróbios  
192 mesófilos nas amostras de cenoura e beterraba lavadas apenas com água potável e  
193 submetidas à temperatura de 10°C.

194





195

196 **Figura 1** – Contagem total de psicrófilos (Log UFC/g) em amostras de cenoura e beterraba  
 197 submetidas à temperatura de 10°C, Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

198

199 Verifica-se que na temperatura de 10°C as amostras de cenoura a partir do T1  
 200 obtiveram maiores médias de contagem total de psicrófilos sendo observado um  
 201 aumento com o passar do tempo de exposição (figura 1). Já para as amostras de  
 202 beterraba verifica-se esse aumento se dá a partir do T2, mantendo-se praticamente  
 203 constante no decorrer das demais horas de exposição (figura1).

204

205 Abadias *et al.* (2012) enfatiza a importância de um rigoroso controle de  
 206 temperatura dos alimentos prontos para o consumo, incluindo principalmente, na  
 207 etapa de distribuição. Cararo e Hautrive (2013) avaliaram as temperaturas das  
 208 saladas em dois supermercados, e verificaram que no supermercado “A” as  
 209 temperaturas de exposição variaram de 8.27°C a 11.10°C e no supermercado “B”  
 210 entre 13.40°C a 17.87°C. Oliveira *et al.* (2011) verificaram a contaminação de  
 211 saladas de cenoura em escolas, sendo que esses alimentos estavam expostos em  
 temperatura inadequada no momento da distribuição.

212

213 Temperaturas inadequadas durante a distribuição para preparações frias  
 214 também foram verificadas em unidades de alimentação e nutrição da cidade de  
 215 Caxias do Sul (RS), sendo que as preparações ficavam expostas em média de 20°C  
 216 durante 2 horas (Medeiros & Saccol, 2013). Chesca, Bataglioni, Faria, Andrade,  
 217 Silveira, e D’Angelis (2011) avaliaram a temperatura das saladas verificaram que  
 todas encontravam-se erradas, com média de 24°C com exposição de 4 horas.

218

219 Marinho, Souza e Ramos (2009) verificaram que somente 8,6% das saladas  
 frias estavam dentro das temperaturas recomendadas pela legislação. Alves e Ueno

220 (2010) avaliaram a temperatura dos alimentos servidos nos balcões de distribuição  
 221 em restaurantes de Taubaté (SP) e verificaram que de todos os alimentos frios,  
 222 apenas um estava em adequado. Em estudo Ri, Figueira, Souza, Basso, e Medina  
 223 (2011), verificaram que os alimentos que mais encontraram-se fora da temperatura  
 224 adequada foram às saladas que de 73 amostras avaliadas, apenas 4 encontravam-  
 225 se abaixo de 10°C, tendo apenas 5% de conformidade.

226 De acordo com a Portaria nº 78, os vegetais folhosos crus, corretamente  
 227 higienizados e não adicionados de molho, maionese, iogurte, creme de leite ou  
 228 demais ligas, preparados e prontos para o consumo, mantidos em temperatura  
 229 ambiente por no máximo 1 hora ou conservados sob refrigeração por períodos  
 230 maiores (Rio Grande do Sul, 2009).

231 Na Tabela 2, estão demonstradas as contagens totais de micro-organismos  
 232 aeróbios mesófilos (Log UFC/g) nas amostras de alface e tomate submetidas à  
 233 temperatura de 20°C. Verifica-se que as maiores médias, foram constatadas nas  
 234 amostras lavadas apenas com água em ambas as hortaliças.

235

236 **Tabela 2** – Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (Log UFC/g) em  
 237 amostras de alfaces e tomates submetidas à temperatura de 20°C e a diferentes  
 238 métodos de sanificação, Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

	ALFACE			TOMATE		
	SEM	HIP	AS	SEM	HIP	AS
	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP
<b>T0</b>	5.52 ± 0.57	3.17 ± 0.46	2.42 ± 0.30	7.32 ± 0.54	3.92 ± 0.66	4.96 ± 0.52
<b>T1</b>	5.47 ± 0.50	3.28 ± 0.31	2.48 ± 0.22	7.54 ± 0.20	4.36 ± 0.66	5.05 ± 0.95
<b>T2</b>	5.53 ± 0.51	3.26 ± 0.32	2.54 ± 0.28	7.91 ± 0.64	4.48 ± 0.40	5.28 ± 0.49
<b>T3</b>	5.60 ± 0.45	3.30 ± 0.41	2.66 ± 0.22	8.04 ± 0.13	4.51 ± 0.48	5.37 ± 0.92
<b>T4</b>	6.25 ± 0.38	3.61 ± 0.20	2.71 ± 0.15	8.61 ± 0.27	4.85 ± 0.39	5.54 ± 0.41

239 HIP: Hipoclorito de Sódio; AS: Água Sanitária; SEM: Sem higienizar

240

241 Quando avaliado os métodos de sanificação utilizados, constatou-se que a  
 242 água sanitária o foi mais eficiente em comparação ao hipoclorito de sódio em pó na  
 243 temperatura de exposição de 20°C, pois apresentaram as menores médias nas  
 244 amostras de alface (tabela 2). Verificou-se também que as amostras de alface em  
 245 temperatura de exposição de 20°C higienizadas com água sanitária, apresentaram a  
 246 menor média inicial (To) (tabela 2).

247 Em estudo que avaliou alfaces higienizadas com hipoclorito de sódio foi  
248 verificado que houve uma redução microbiana de 1 a 2 log UFC/g em 10 min.  
249 (Pereira, Rodrigues, & Ramalhosa, 2013). Na indústria de alimentos e nos serviços  
250 de alimentação o hipoclorito é o produto mais utilizado como sanitizante devido seu  
251 custo e conveniência (Fontana, 2006). De acordo com Pangloli e Hung (2013) as  
252 hortaliças higienizadas com água clorada contendo 200 ppm foram as que obtiveram  
253 menor contagem total de micro-organismos comparadas às amostras lavadas  
254 apenas com água.

255 López-Fernández, Rial-Otero e Simal-Gándara (2013) avaliaram a  
256 higienização de alfaces e verificaram que o uso de produtos contendo cloro reduziu  
257 a contagem de micro-organismos totais mais do que a água corrente. Santos et al.  
258 (2012) avaliaram amostras de alfaces comercializadas em Teresina (PI), e  
259 verificaram uma diminuição significativa na contagem total de bactérias mesófilas  
260 após 15 minutos de imersão em solução clorada a 200 ppm em comparação as  
261 amostras lavadas somente com água.

262 Nas amostras de tomates verifica-se que as higienizadas com hipoclorito de  
263 sódio em pó obtiveram as menores médias de micro-organismos aeróbios mesófilos,  
264 conforme demonstrado na tabela 2, diferindo da alface na mesma temperatura.  
265 Esses resultados corroboram com Fernandes, São José, Zerdas, Andrade,  
266 Fernandes, e Silva (2014) no qual avaliaram a eficiência dos procedimentos de  
267 sanitização, e verificaram que produtos a base de cloro foram mais eficiente ( $p$   
268  $<0,05$ ) para as amostras de tomate. Em estudo Dartora (2013) avaliou amostras de  
269 tomate higienizadas com hipoclorito a 200 ppm e verificou uma redução de mais de  
270 dois ciclos microbianos em relação às amostras não higienizadas.

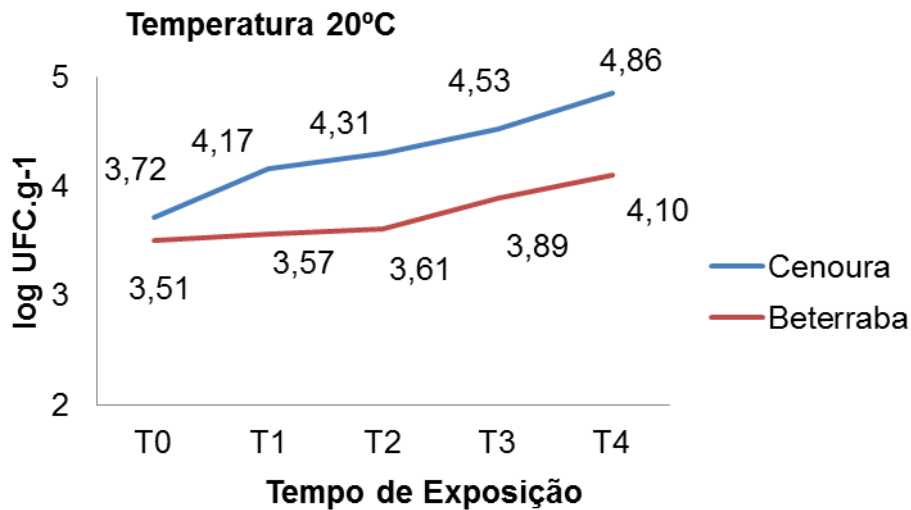
271 Em estudo Allende, Selma, López-Gálvez, Villaescusa, e Gil (2008),  
272 observaram que, a contagem total de bactérias foi maior em alimentos lavados  
273 somente com água potável, comparado com as amostras higienizadas com produtos  
274 clorados. Keskinen e Annous (2011) afirmam que o uso de produtos saneantes pode  
275 diminuir a carga bacteriana em torno de 3 log UFC/g, de acordo com a concentração  
276 e o tempo de contato dos produtos. Em contrapartida, na lavagem em água corrente  
277 essa redução atinge no máximo de 1 logUFC/g (Doménech, Botella, Ferrús, &  
278 Escriche, 2013).

279 Outros autores também afirmam que a lavagem com água e o uso de  
280 soluções desinfetantes podem reduzir as contagens iniciais de micro-organismos

281 mesófilos em torno de 1 e 3 log UFC/g em hortaliças respectivamente (Beuchat,  
 282 Adler, & Lang, 2004; Gonzalez, Luo, Ruiz-Cruz, & McEvoy, 2004; Inatsu, Bari,  
 283 Kawasaki, Isshiki, & Kawamoto, 2005; Ukuku, Bari, Kawamoto, & Isshiki, 2005;  
 284 Allende, Martínez, Selma, Gil, Suárez, & Rodríguez, 2007; Gómez-López,  
 285 Devlieghere, Ragaert, & Debevere, 2007; Selma, Allende, López-Gálvez, Conesa, &  
 286 Gil, 2008).

287 Na figura 2 está demonstrada a contagem total de micro-organismos aeróbios  
 288 mesófilos nas amostras de cenoura e beterraba lavadas apenas com água potável e  
 289 submetidas à temperatura de 20°C.

290



291

292 **Figura 2** – Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (Log UFC/g) em amostras de  
 293 cenoura e beterraba submetidas à temperatura de 20°C, Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

294

295 Verifica-se que as amostras de cenoura apresentaram maiores contagens de  
 296 micro-organismos aeróbios mesófilos na temperatura de 20°C (figura 2). Em estudo  
 297 realizado sobre a microbiota presente em vegetais constatou-se que a cenoura  
 298 ralada foi a que apresentou resultados com contagens mais altas (aeróbios totais)  
 299 em comparação com outras hortaliças (Abadias *et al.*, 2008).

300

301 Na Tabela 3, estão demonstradas as contagens totais de micro-organismos  
 302 aeróbios mesófilos (Log UFC/g) nas amostras de alface e tomate submetidas à  
 303 temperatura de 30°C. Verifica-se que as maiores médias, também foram  
 constatadas nas amostras lavadas apenas com água em ambas as hortaliças.

304

305 **Tabela 3** – Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (Log UFC/g) em  
 306 amostras de alfaces e tomates submetidas à temperatura de 30°C e a diferentes  
 307 métodos de sanificação, Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

	ALFACE			TOMATE		
	SEM	HIP	AS	SEM	HIP	AS
	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP	Med. ± DP
<b>T0</b>	5.08 ± 0.71	2.74 ± 0.59	3.41 ± 0.18	7.71 ± 0.77	3.37 ± 0.60	4.55 ± 0.58
<b>T1</b>	5.45 ± 0.14	3.80 ± 0.08	4.41 ± 0.64	8.83 ± 0.19	3.41 ± 0.36	5.07 ± 0.43
<b>T2</b>	5.68 ± 0.62	3.74 ± 0.21	4.53 ± 0.19	9.13 ± 0.50	3.77 ± 0.18	5.47 ± 0.65
<b>T3</b>	6.90 ± 0.18	3.87 ± 0.39	4.62 ± 0.24	9.81 ± 0.21	3.85 ± 0.94	5.92 ± 0.90
<b>T4</b>	6.96 ± 0.22	3.93 ± 0.57	4.65 ± 0.71	9.88 ± 0.12	3.89 ± 0.18	6.49 ± 0.42

308 HIP: Hipoclorito de Sódio; AS: Água Sanitária; SEM: Sem higienizar

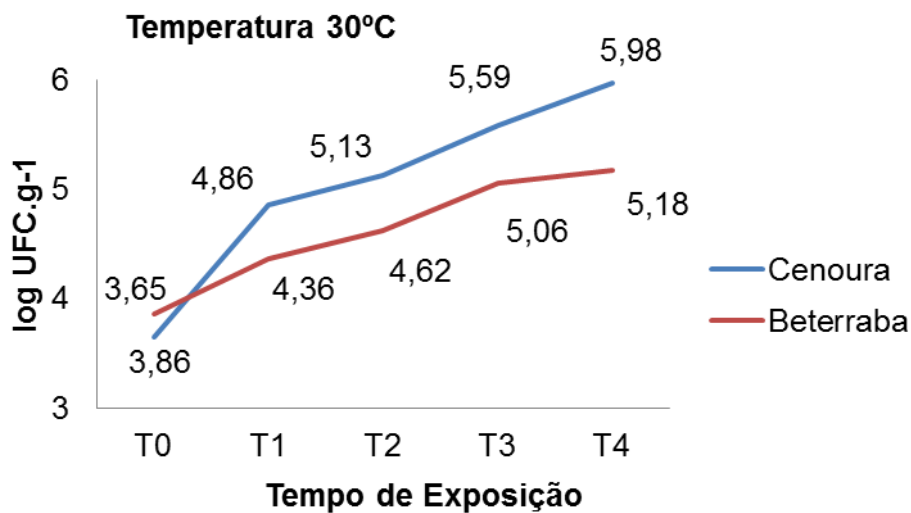
309

310 Verifica-se na tabela 3 que as amostras higienizadas com hipoclorito de sódio  
 311 em pó foram as que obtiveram as menores médias de micro-organismos aeróbios  
 312 mesófilos em ambas as hortaliças avaliadas.

313 Alguns autores sugerem que a lavagem de hortaliças folhosas com produtos  
 314 clorados reduz a contagem inicial de mesófilos totais, mas esse número pode  
 315 aumentar se durante o armazenamento os alimentos forem submetidos em  
 316 temperaturas inadequadas (Gonzalez, Luo, Ruiz-Cruz, & McEvoy, 2004; Beltrán,  
 317 Selma, Tudela, & Gil, 2005; Gómez-López, Devlieghere, Ragaert, & Debevere,  
 318 2007). O armazenamento em temperaturas altas (em torno de 20°C) aumentou a  
 319 probabilidade de crescimento, de bactérias patogênicas em alfaces em estudos  
 320 realizados por Abadias, Alegre, Usall, Torres e Viñas (2011) e Robin, LeBlanc,  
 321 Rodríguez e Delaquis (2014).

322 Na figura 3 está demonstrada a contagem total de micro-organismos aeróbios  
 323 mesófilos nas amostras de cenoura e beterraba lavadas apenas com água potável e  
 324 submetidas à temperatura de 30°C.

325



326

327 **Figura 3** – Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (Log UFC/g) em amostras de  
328 cenoura e beterraba submetidas à temperatura de 30°C, Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

329

330 Verifica-se na figura 3 que as amostras de cenoura obtiveram um aumento  
331 na contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos com o passar do tempo de  
332 exposição à temperatura de 30°C, sendo esse maior que a contagem de micro-  
333 organismos nas amostras de beterraba. Os micro-organismos mesófilos  
334 (temperatura de crescimento entre 25 e 40°C) são os mais comumente encontrados,  
335 e possuem temperatura ótima de crescimento em torno de 37°C. Os mesófilos  
336 incluem a maioria dos micro-organismos deteriorantes e patogênicos (Jay, 2005).

337

338 Em relação à NMP de termotolerantes, constatou-se que todas as amostras  
339 avaliadas, independente da temperatura e tratamento realizado, apresentaram-se  
340 dentro do limite permitido pela legislação sanitária vigente (Brasil, 2001). Isso  
341 demonstra que independente do tipo de tratamento realizado, as hortaliças não  
342 apresentaram risco em relação ao crescimento microbiano acima do padrão exigido  
343 pela legislação brasileira. Vale ressaltar também, que não foi evidenciada a  
344 presença de *Escherichia coli* nas amostras avaliadas.

344

345 Coliformes termotolerantes foram detectados em 25% das amostras de  
346 cenoura, sendo que nas amostras de tomate avaliadas não apresentaram (Arbos *et*  
347 *al.*, 2010). Estudo realizado por Foley, Euper, Caporaso, e Prakash (2004)  
348 verificaram a eficiência do uso de sanitizantes a base de cloro na redução de  
349 *Escherichia coli* O157:H7. Os mesmos resultados foram encontrados por Behrsing,  
350 Winkler, Franz, e Premier (2000) em amostras de alfaces higienizadas com produtos  
a base de cloro.

351 A higienização de hortaliças com sanitizante também reduziu a contaminação  
352 por *Escherichia coli* O15:H7 de alfaces em serviços de alimentação (Pangloli, Hung,  
353 Beuchat, King, & Zhao, 2009). Esses resultados corroboram com o presente estudo  
354 no qual não foi constatado contaminação após a higienização das amostras de  
355 alface e tomate.

356 Pangloli e Hung (2013) verificaram que a sanificação utilizando água sanitária  
357 a 200 ppm foi mais eficiente para a inativação *Escherichia coli* O157:H7. Niemira  
358 (2007) também constatou que o hipoclorito de sódio a 300 ou 600 ppm foi  
359 significativamente mais eficiente do que a água na redução desse micro-organismo  
360 em espinafres.

361 Estudos realizados por Yarahmadi et al. (2012) avaliaram a eficácia da  
362 remoção de coliformes totais e termotolerantes, pelo método de desinfecção  
363 proposto pelo Ministério da Saúde do estado do Irã. Os autores verificaram que a  
364 lavagem somente com água reduziu em 78.1% e 79.6% a presença de coliformes  
365 totais e termotolerantes respectivamente em comparação com o uso de um produto  
366 clorado (98.3% e 100%).

367 Verificou-se nesse estudo que as amostras de tomate apresentaram-se  
368 dentro do limite permitido pela legislação sanitária vigente em relação a coliformes  
369 totais. Esse resultado corrobora com Dartora (2013), que após análise de coliformes  
370 totais e termotolerantes em amostras higienizadas com hipoclorito e com água,  
371 todas encontravam-se dentro do limite permitido pela legislação. Teixeira, Santos,  
372 Moreira, Sousa, e Nunes (2013) verificaram a presença de coliformes totais em  
373 todas as amostras de tomate avaliadas, e coliformes termotolerantes em 37.5%. A  
374 lavagem com água foi capaz de remover de 1 a 2 logs de *Escherichia coli* O157:H7  
375 em amostras de tomate (Venkitanarayanan, Lin, Bailey, & Doyle, 2002).

376 Segundo estudo de Nascimento, Mouchrek Filho, Bayma, e Marques (2002) e  
377 Santos, Balioni, Soares, e Ribeiro (2004), o hipoclorito teve melhor resultado como  
378 sanitizante na redução do número de coliformes totais e eliminação dos  
379 termotolerantes. Lund, Petrini, Aleixo, e Rombaldi (2005), também observaram em  
380 seu estudo que esse produto se mostrou mais eficiente, reduzindo a contaminação  
381 dos coliformes termotolerantes, destacando-se assim seu efeito sanitizante.

382 As bactérias do grupo coliformes são comuns nos alimentos, pois se originam  
383 do solo de cultivo, porém a *Escherichia coli* enteropatogénicas (EPEC), *Escherichia*  
384 *coli* enterotoxigénicas (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC) e *Escherichia*

385 *coli* enterohemorrágicas (EHEC), onde se inclui *Escherichia coli* O157:H7 não devem  
386 estar presentes nos alimentos, pois são consideradas patogênicas (Fallah, Pirali-  
387 Kheirabadi, Shirvani, & Saei-Dehkordi, 2011).

388 Neste sentido os alimentos devem ser cultivados em solo sem contaminação  
389 fecal, com água de boa qualidade e com boas práticas de manipulação (Fallah,  
390 Pirali-Kheirabadi, Shirvani, & Saei-Dehkordi, 2011). Os coliformes termotolerantes  
391 são micro-organismos indicadores de contaminação de origem fecal, que implica no  
392 contato dos alimentos com as fezes humanas ou dos animais (Oliveira, Brandelli, &  
393 Tondo, 2006).

394 Outro aspecto importante a ser destacado é que independente da  
395 temperatura todas as amostras encontraram-se dentro dos limites aceitáveis  
396 exigidos pela legislação vigente (coliformes fecais: valores menores ou iguais a  $10^2$   
397 NMP/g) (Brasil, 2001), sugerindo que esses alimentos podem ser expostos a uma  
398 temperatura maior do que traz as legislações do Brasil.

399 Assim, para garantir a segurança do alimento em relação às temperaturas de  
400 exposição e também da realização correta do procedimento exigido pelas  
401 legislações outras recomendações devem ser testadas, assim como o presente  
402 estudo. Segundo Jaloustre, Guillier, Morelli, Noël e Delignette-Muller (2012), as  
403 temperaturas de distribuição dos alimentos ou recomendações devem ser validadas,  
404 isto é, existe uma necessidade de proporcionar evidência para que sejam eficazes e  
405 aplicáveis.

406 Na avaliação a *Salmonella* ssp em 25 gramas de amostras de alface, tomate,  
407 cenoura e beterraba constatou-se que todas apresentaram ausência, o que  
408 demonstra também conformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos  
409 pela legislação (Brasil, 2001).

410 Em estudo Velázquez, Barbini, Escudero, Estrada e Guzmán (2009) não  
411 encontravam contaminação por *Salmonella* ssp em alfaces higienizadas com  
412 hipoclorito de sódio em pó, o que concorda com os resultados desse estudo. Dartora  
413 (2013) não encontraram a presença de *Salmonella* ssp em tomates higienizados  
414 com hipoclorito, somente nas amostras que não foram higienizadas. Uma redução  
415 de *Salmonella* spp. de 1,0 log após lavagem de tomates com 200 ppm de cloro livre  
416 foi verificada em estudo de Weissinger, Chantarapanont e Beuchat (2000).

417 Estudos demonstram que a contaminação dos alimentos por *Salmonella* ssp é  
418 comum. Santos, Cunha, Bittencourt, Rego e Leite (2011) avaliaram a presença de



419 *Salmonella* em hortaliças, e constataram que de 241 amostras avaliadas, 7 delas  
420 foram positivas sendo identificadas como causa de surtos na cidade de Salvador  
421 (BA). A salmonelose, também tem sido associada com o consumo de vegetais crus  
422 como tomate e cenoura (Islam et al., 2004; Barak & Liang, 2008).

423 A presença de *Salmonella* sp. foi verificada em 25% das amostras de cenoura  
424 em estudo realizado por Arbos et al. (2010). A *Salmonella* spp. é um micro-  
425 organismo entérico amplamente difundido na natureza, sendo o homem e animais  
426 seus principais reservatórios. As gastroenterites causadas por *Salmonella*,  
427 geralmente estão associadas à ingestão de alimentos manipulados com condições  
428 inadequadas de higiene e o consumo de ovos e derivados, carne de bovinos e aves  
429 e vegetais contaminados e/ou mal higienizados, assim como de alimentos  
430 consumidos crus ou mal cozidos (Jay, 2005).

431 Em relação à *Staphylococcus* coagulase positiva, constatou-se que todas as  
432 amostras avaliadas, independente da temperatura e do tratamento não  
433 apresentaram contaminação. Resultado esse esperado, pois as amostras desse  
434 estudo não foram coletadas de serviços de alimentação, onde seriam manipuladas.

435 O *Staphylococcus* está presente nas vias nasais e na garganta, além do  
436 cabelo e na pele. Segundo Tondo e Bartz (2012), cerca de 30 a 40% dos humanos  
437 são portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus*. Soares, Almeida,  
438 Cerqueira, Carvalho e Nunes (2012), constataram a presença de *Staphylococcus*  
439 coagulase positiva em 53% dos manipuladores de alimentos. Acikel, Ogur, Yaren,  
440 Gocgeldi, Ucar e Kir (2008), constataram a presença desse micro-organismo em  
441 95% dos manipuladores.

442 A intoxicação causada por alimentos contendo enterotoxinas de  
443 *Staphylococcus aureus* é um dos tipos mais comuns de doenças transmitidas por  
444 alimentos no mundo (Pigott, 2008). Os manipuladores de alimentos são,  
445 normalmente, as principais fontes de contaminação dos alimentos, quando há surtos  
446 *Staphylococcus aureus* (Forsythe, 2010). Por isso ressalta-se a importância das  
447 atividades que o manipulador desempenha nos serviços de alimentação, pois esse  
448 está em contato direto com o produto. Wang, Zhu, Xu e Zhou (2012) destacam que  
449 os manipuladores de alimentos são considerados requisitos problemáticos nas  
450 empresas alimentícias.

451 Em estudo Soon, Baines e Seaman (2012), demonstraram que os  
452 manipuladores de alimentos, apresentam baixo conhecimento em relação à

453 higienização em serviços de alimentação, principalmente quanto à higiene pessoal,  
454 o que pode levar a contaminação dos alimentos.

455 Através de evidências da literatura, pode-se contatar que mesmo que o  
456 alimento passe por um adequado procedimento de higienização, se o manipulador  
457 não tiver cuidados nas etapas seguintes, ele pode contaminar novamente o produto  
458 que já foi higienizado. Por esse motivo que Soares, García-Díez, Esteves, Oliveira, e  
459 Saraiva (2013) reforçam a importância das capacitações para a manutenção das  
460 condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos alimentícios.

461 Embora a escassez de dados na literatura dificulte comparações, situações  
462 semelhantes às encontradas nesse trabalho podem estar ocorrendo em serviços de  
463 alimentação do Brasil. Isso faz com que estudos de intervenção sejam  
464 desenvolvidos com objetivo de melhorar as condições higiênico-sanitárias dos  
465 alimentos, proteger a saúde do consumidor e estar em conformidade com as  
466 legislações sanitárias.

467

#### 468 **4. Conclusão**

469

470 Desta forma pode-se concluir que as maiores médias na contagem total de  
471 micro-organismos aeróbios mesófilos nas hortaliças, foram constatadas nas  
472 amostras lavadas apenas com água conforme o esperado, independente da  
473 temperatura em que foram submetidas.

474 Em relação ao NMP de termotolerantes e a presença de *Salmonella* ssp.,  
475 constatou-se que todas as amostras avaliadas, independente da temperatura e  
476 tratamento realizado, apresentaram-se dentro do limite permitido pela legislação  
477 sanitária vigente. Nenhuma das amostras avaliadas contatou-se *Staphylococcus*  
478 coagulase positiva.

479 Independente da temperatura todas as amostras encontraram-se dentro dos  
480 limites aceitáveis exigidos pela legislação vigente, sugerindo que esses alimentos  
481 podem ser expostos a uma temperatura maior do que traz as legislações do Brasil.

482 Sugere-se também que outros estudos sejam realizados avaliando em outros  
483 alimentos a qualidade microbiológica em diferentes binômios de tempos e  
484 temperaturas de exposição com objetivo de garantir a qualidade higiênico-sanitária  
485 do alimento e a proteção da saúde do consumidor.

486

487 **Referências**

488

489 Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological  
490 quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail  
491 establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 121-129.

492

493 Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Torres, R., & Viñas. (2011). Evaluation of alternative  
494 sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in freshcut apple.  
495 *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 289-297.

496

497 Abadias, M., Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R., & Viñas, I. (2012). Growth potential  
498 of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables  
499 (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food Control*, 27(1), 37-44.

500

501 Acikel, C. H., Ogur, R., Yaren, H., Gocgeldi, E., Ucar, M., & Kir, T. (2008). The  
502 hygiene training of food handlers at a teaching hospital. *Food Control*, 19(2), 186-  
503 190.

504

505 Akutsu, R. C., Botelho, R. A., Camargo, E. B., Sávio, K. E. O., & Araújo, W. C.  
506 (2005). Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação.  
507 *Revista de Nutrição*, 18(3), 419-427.

508

509 Allende, A., Martínez, B., Selma, V., Gil, M. I., Suárez, J. E., & Rodríguez, A. (2007).  
510 Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their  
511 effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce.  
512 *Food Microbiology*, 24(7-8), 759-766.

513

514 Allende, A., Selma, M. V., López-Gálvez, F., Villaescusa, R., & Gil, M. I. (2008).  
515 Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia*  
516 *coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. *Journal of Food Protection*, 71(12),  
517 2514-2518.

518

519 Alves, M. G., & Ueno, M. (2010). Restaurantes *self-service*: segurança e qualidade  
520 sanitária dos alimentos servidos. *Revista de Nutrição*, 23(4), 573-580.

- 521 Arbos, K.A., Freitas, R.J.S., Stertz, S.C., & Carvalho, L.A. (2010). Segurança  
522 alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. *Ciência e*  
523 *Tecnologia dos Alimentos*, 30(1), 215-220.
- 524
- 525 Barak, J.D., & Liang, A.S. (2008). Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in  
526 *Salmonella enterica* contamination of tomato plants. *PLoS One*, 3, 1-5.
- 527
- 528 Behrens, J. H., Barcellos, M. N., Frewer, L. J., Nunes, T. P., Franco, B. D. G. M., &  
529 Destro, M. T. et al. (2010). Consumer purchase habits and views on food safety: A  
530 Brazilian study. *Food Control*, 21(7), 963–969.
- 531
- 532 Behrsing, J., Winkler, S., Franz, P., & Premier, R. (2000). Efficacy of chlorine for  
533 inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. *Postharvest Biology and Technology*,  
534 19(2), 187-192.
- 535
- 536 Beltrán, D., Selma, M. V., Tudela, J. A., & Gil, M. I. (2005). Effect of different  
537 sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under  
538 modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biology and Technology*,  
539 37(1), 37-46.
- 540
- 541 Beuchat, L. R., Adler, B. B., & Lang, M. M. (2004). Efficacy of chlorine and a  
542 peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine  
543 lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food*  
544 *Protection*, 67 (6), 1238-1242.
- 545
- 546 Brasil. (2001). *Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.*  
547 *Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.* Diário  
548 Oficial da República Federativa do Brasil.
- 549
- 550 Brasil. (2003). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de*  
551 *Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa*  
552 *os métodos analíticos para análises microbiológicas para produtos de origem animal*  
553 *e água.* Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- 554

- 555 Brasil. (2004). *Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de*  
556 *2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de*  
557 *alimentação*. Diário Oficial da União, Brasília.
- 558
- 559 Brasil. (2013). *Ministério da Saúde. Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a*  
560 *2013\**.  
561 <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10\\_passos\\_para\\_investigacao\\_surtos.](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf)  
562 [pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf)>.
- 563
- 564 Buzby, J. C., & Roberts, T. (2009). The Economics of Enteric Infections: Human  
565 Foodborne Disease Costs. *Gastroenterology*, 136(6), 1851–1862.
- 566
- 567 Cararo, N., & Hautrive, T.P. (2013). Qualidade e apresentação de saladas servidas  
568 na rotisseria de uma rede de supermercados. *Revista Brasileira de Tecnologia*  
569 *Agroindustrial*, 7(1), 943-954.
- 570
- 571 Castro, R. S. D. (2013). *Boas Práticas de Fabricação (BPF), análise de tomate e*  
572 *água em restaurantes da cidade de Botucatu-SP [doutorado]*. Botucatu:  
573 Universidade Estadual Paulista.
- 574
- 575 Chesca, A.C., Bataglioni, C. C. V., Faria, S. C. P., Andrade, S. C. B. J., Silveira, M.,  
576 & D'Angelis, C. E. M. (2011). Refeições transportadas: importância do controle de  
577 temperatura. *Higiene Alimentar*, 25(2), 93-100.
- 578
- 579 Dartora, M. (2013). *Avaliação da descontaminação do Lycopersicon esculentum mill.*  
580 *(Tomate) [monografia]*. Cascavel: Faculdade Assis Gurgacz.
- 581
- 582 Ding, T., Iwahori, J., Kasuga, F., Wang, J., Forghani, F., & Park, M. et al. (2013). Risk  
583 assessment for *Listeria monocytogenes* on lettuce from farm to table in Korea. *Food*  
584 *Control*, 30(1), 190-199.
- 585
- 586 Doménech, E., Botella, S., Ferrús, M. A., & Escriche, I. (2013). The role of the  
587 consumer in the reduction of *Listeria monocytogenes* in lettuces by washing at home.  
588 *Food Control*, 29(1), 98-102.

- 589 Fallah, A.A., Pirali-Kheirabadi, K., Shirvani, F., & Saei-Dehkordi, S. S. (2011).  
590 Prevalence of parasitic contamination in vegetables used for raw consumption in  
591 Shahrekord, Iran: influence of season and washing procedure. *Food Control*, 25(2),  
592 617-620.
- 593
- 594 Fernandes, P.É., São José, J. F. B., Zerdas, E. R. M. A., Andrade, N. J., Fernandes,  
595 C. M. & Silva, L. D. (2014). Influence of the hydrophobicity and surface roughness of  
596 mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium  
597 and evaluation of cleaning procedures using surfactin. *Food Control*, 41, 21-26.
- 598
- 599 Foley, D., Euper, M., Caporaso, F., & Prakash, A. (2004). Irradiation and chlorination  
600 effectively reduces *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on cilantro (*Coriandrum*  
601 *sativum*) without negatively affecting quality. *Journal of Food Protection*, 67(10),  
602 2092-2098.
- 603
- 604 Fontana, N. (2006). *Atividade antimicrobiana de desinfetantes utilizados na*  
605 *sanitização de alface [monografia]*. Santa Maria: Centro Universitário Franciscano  
606 (Unifra).
- 607
- 608 Forsythe, S. J. (2010). *The microbiology of safe food*. (6<sup>th</sup> ed.). Chichester, United  
609 Kingdom, Wiley-Blackwell.
- 610
- 611 Germano, M.I.S., Germano, P. M. L., Kamei, C. A. K., Abreu, E. S., Ribeiro, E. R., &  
612 Silva, K. C. et al. (2000). Manipuladores de alimentos: Capacitar? E preciso.  
613 Regulamentar?...Será preciso???. *Higiene Alimentar*, 14(78-79), 18-22.
- 614
- 615 Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Ragaert, P., & Debevere, J. (2007). Shelf-life  
616 extension of minimally processed carrots by gaseous chlorine dioxide. *International*  
617 *Journal of Food Microbiology*, 116(2), 221-227.
- 618
- 619 Gonzalez, R.J., Luo, Y., Ruiz-Cruz, S., & McEvoy, J. L. (2004). Efficacy of sanitizers  
620 to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut carrot shreds under simulated  
621 process water conditions. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2375-2380.
- 622

- 623 Gurudasani, R., & Sheth, M. (2009). Food safety knowledge and attitude of  
624 consumers of various foodservice establishments. *Journal of Food Safety*, 29(3),  
625 364-380.
- 626
- 627 Haapala, I., & Probart, C. (2004). Food safety knowledge, perceptions, and behaviors  
628 among middle school students. *Journal of nutrition education and behavior*, 36(2),  
629 71-76.
- 630
- 631 Inatsu, Y., Bari, M. L., Kawasaki, S., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Efficacy of  
632 acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese  
633 cabbage. *Journal of Food Protection*, 68(2), 251-255.
- 634
- 635 Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Fate  
636 of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on carrots and radishes grown in fields  
637 treated with contaminated manure compost for irrigation water. *Applied and*  
638 *Environmental Microbiology*, 70(4), 2497-2502.
- 639
- 640 Jaloustre, S., Guillier, L., Morelli, E., Noël, V., & Delignette-Muller, M. L. (2012).  
641 Modeling of *Clostridium perfringens* vegetative cell inactivation in beef-in-sauce  
642 products: a meta-analysis using mixed linear models. *International Journal of Food*  
643 *Microbiology*, 154(1-2), 44-51.
- 644
- 645 Jay, J. (2005). *Microbiologia de alimentos*. (6th ed), Editora ArtMed, Porto Alegre.
- 646
- 647 Keskinen, L. A., & Annous, B. A. (2011). Efficacy of adding detergents to sanitizer  
648 solutions for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Romaine lettuce.  
649 *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 157-161.
- 650
- 651 López-Fernández, O., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2013). Factors governing  
652 the removal of mancozeb residues from lettuces with washing solutions. *Food*  
653 *Control*, 34(2), 530-538.
- 654

- 655 Lund, D.G., Petrini, L. A., Aleixo, J. A. G., & Rombaldi, C. V. (2005). Uso de  
656 sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente  
657 processada. *Ciência Rural*, 35(6), 1431-1435.
- 658
- 659 Marinho, C. B., Souza, C. S, & Ramos, S. A. (2009). Avaliação do binômio tempo-  
660 temperatura de refeições transportadas. *Revista E-Scientia*, 2(1).
- 661
- 662 Martins, R. B., Hogg, T., & Otero, J. G. (2011). Food handlers' knowledge on food  
663 hygiene: The case of a catering company in Portugal. *Food Control*, 23(1), 184-190.
- 664
- 665 Matsubara, M. T., Beloti, V., Tamanini, R., Fagnani, R., Silva, L. C. C., & Monteiro, A.  
666 A. et al. (2011). Boas Práticas de ordenha para a redução da contaminação  
667 microbiológica do leite no agreste de Pernambuco. *Ciências Agrárias*, 32(1), 277-  
668 286.
- 669
- 670 Medeiros, L. B., Saccol, A. L. F., Delevati, M. T. S, & Brasil, C. C. B. (2012).  
671 Diagnóstico das condições higiênicas de serviços de alimentação de acordo com a  
672 NBR 15635:2008. *Brazilian Journal of Food Technology*, IV SSA, 47-52.
- 673
- 674 Medeiros, L. B., & Saccol, A. L. F. (2013). Avaliação de temperaturas em unidades  
675 de alimentação e nutrição de Caxias do Sul – RS. *Higiene Alimentar*, 27(218/219),  
676 62-66.
- 677
- 678 Momesso, A. P., Matté, M. H., & Germano, P. M. L. (2005). Avaliação das condições  
679 higiênico-sanitárias, por quilo, do município de São Paulo, durante o período de  
680 distribuição de refeições. *Higiene Alimentar*, 19(136), 81-89.
- 681
- 682 Morelli, E., Noel, V., Rosset, P., & Poumeyrol, G. (2012). Performance and conditions  
683 of use of refrigerated display cabinets among producer/vendors of foodstuffs. *Food*  
684 *Control*, 26(2), 363-368.
- 685
- 686 Nascimento, A.R., Mouchrek Filho, J. E., Bayma, A. B., & Marques, C. M. P. (2002).  
687 Sanitização de saladas in natura oferecidas em restaurantes *self-service* de São



- 688 Luis, MA. *Higiene Alimentar*, 16(92), 63-67.  
689
- 690 Niemira, B. A. (2007). Relative efficacy of sodium hypochlorite wash versus  
691 irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of romaine  
692 lettuce and baby spinach. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2526-2532.  
693
- 694 Oliveira, A. M., Brasil, A. L. D., & Taddei, J. A. A. C. (2003). Manipuladores de  
695 alimentos: um fator de risco. *Higiene Alimentar*, 17(114), 12-19.  
696
- 697 Oliveira, F. A., Brandelli, A., & Tondo, E. C. (2006). Antimicrobial resistance in  
698 *Salmonella Enteritidis* from foods involved in human salmonellosis outbreaks in  
699 southern Brazil. *The New Microbiologica*, 29(1), 49-55.  
700
- 701 Oliveira, A.B.A., Capalonga, R., Silveira, J.T., Tondo, E.C., & Cardoso, M.R.I. (2011).  
702 Avaliação da presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários em  
703 alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre, Brasil. *Ciência e Saúde*  
704 *Coletiva*, 18(4), 955-962.  
705
- 706 Pangloli, P., Hung, Y. C., Beuchat, L. R., King, C. H., & Zhao, Z. H. (2009). Reduction  
707 of *Escherichia coli* O157:H7 on produce by use of electrolyzed water under simulated  
708 food service operation conditions. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1854-1861.  
709
- 710 Pangloli, P., & Hung, Y. (2013). Effects of water hardness and pH on efficacy of  
711 chlorine-based sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria*  
712 *monocytogenes*. *Food Control*, 32(2), 626-631.  
713
- 714 Penteadó, A. L., & Leitão, M. F. F. (2004). Growth of *Salmonella enteritidis* in melon,  
715 watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. *Food*  
716 *Control*, 15(5), 369-373.  
717
- 718 Pereira, E. L., Rodrigues, A., & Ramalhosa, E. (2013). Influence of working  
719 conditions and practices on fresh-cut lettuce salads quality. *Food Control*, 33 (2),  
720 406-412.

- 721 Pigott, D. C. (2008). Foodborne illness. *Emergency Medicine Clinics of North*  
722 *America*, 26(2), 475-497.
- 723
- 724 Poumeyrol, E., Morelli, E., Noel, V., & Cornu, M. (2012). Impact of the method  
725 chosen for measuring temperatures on the efficacy of rapid cooling of foods in  
726 catering facilities. *Food Control*, 23(2), 345-350.
- 727
- 728 Ri, D. D., Figueira, V., Souza, R. P., Basso, C., & Medina, V. B. (2011). Temperatura  
729 dos equipamentos e dos alimentos durante a distribuição em um restaurante de  
730 Santa Maria. *Disciplinarum Scientia*, 12(1), 139-145.
- 731
- 732 Rio Grande do Sul. (2009). *Secretaria da Saúde. Portaria nº 78 de janeiro de 2009.*  
733 *Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação,*  
734 *aprova Normas para cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de*  
735 *Alimentação e dá outras providências.* Diário Oficial do Estado do Rio Grande do  
736 Sul.
- 737
- 738 Robin, C., LeBlanc, D. I., Rodríguez, F. P., & Delaquis, P. (2014). Comparative  
739 simulation of *Escherichia coli* O157:H7 behaviour in packaged fresh-cut lettuce  
740 distributed in a typical Canadian supply chain in the summer and winter. *Food*  
741 *Control*, 35(1), 192-199.
- 742
- 743 Rodrigues, K. R. M., & Salay, E. (2012). Food safety control in in-house and  
744 outsourced food services and fresh vegetable suppliers. *Food Control*, 25(2), 767-  
745 772.
- 746
- 747 Saccol, A. L. F., Stangarlin, L., Richards, N. S., & Hecktheuer, L. (2009). Avaliação  
748 das Boas Práticas em duas visões: técnica e da empresa. *Brazilian Journal of Food*  
749 *Technology*, II SSA, 19-23.
- 750
- 751 Santos, H.S., Muratori, M. C. S., Marques, A. L. A., Alves, V. C., Cardoso Filho, F.  
752 C., & Costa, A. P. R. et al. (2012). Avaliação da eficácia da água sanitária na  
753 sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*). *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 71(1), 56-  
754 60.

- 755 Santos, M.S., Cunha, A. C. S., Bittencourt, L. R., Rego, F. L. T., & Leite, C. C.  
756 (2011). Prevalência de *Salmonella* não enteritidis isoladas de alimentos notificados  
757 através do sistema de vigilância sanitária do estado da Bahia. *Higiene Alimentar*,  
758 25(200/201), 131-136.
- 759
- 760 Santos, T.B.A., Balioni, G. A., Soares, M. M. S. R., & Ribeiro, M. C. (2004).  
761 Condições higiênico-sanitárias de alfaces antes e após tratamento com agente  
762 antibacteriano. *Higiene Alimentar*, 18(121), 85-89.
- 763
- 764 São Paulo. (2013). *Centro de Vigilância Sanitária. Portaria CVS nº. 05, de 09 de abril*  
765 *de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos*  
766 *comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção,*  
767 *anexo. São Paulo.*
- 768
- 769 Scallan, E., & Mahon, B. E. (2012). Foodborne Diseases Active Surveillance Network  
770 (FoodNet) in 2012: A Foundation for Food Safety in the United States. *Clinical*  
771 *Infectious Diseases*, 54(S5), 381-384.
- 772
- 773 Selma, M.V., Allende, A., López-Gálvez, F., Conesa, M. A., & Gil, M. I. (2008).  
774 Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for  
775 the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiology*, 25(6), 809-814.
- 776
- 777 Seo, S., Seo, H., Cha, M., & Oh, M. (2010). Microbiological analysis of cooked bean  
778 sprout salad consumed in Korea. *Journal of Food Safety*, 30(3), 753-767.
- 779
- 780 Silva Júnior, E.A. (2012). *Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de*  
781 *alimentação*. 7. ed. São Paulo: Varela.
- 782
- 783 Soares, K., García-Díez, J., Esteves, A., Oliveira, I., & Saraiva, C. (2013). Evaluation  
784 of food safety training on hygienic conditions in food establishments. *Food Control*,  
785 34(2), 613-618.
- 786
- 787 Soares, L.S., Almeida, R. C. C., Cerqueira, E. S., Carvalho, J. S., & Nunes, I. L.  
788 (2012). Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of

- 789 coagulase positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of  
790 Camaçari, Brazil. *Food Control*, 27(1), 206-213.
- 791
- 792 Soon, J. M., Baines, R., & Seaman, P. (2012). Meta-analysis of food safety training  
793 on hand hygiene knowledge and attitudes among food handlers. *Journal of Food*  
794 *Protection*, 75(4), 793-804.
- 795
- 796 Stangarlin, L, Hecktheuer, L., Serafim, A. L., & Saccol, A. L. F. (2013). *Instrumentos*  
797 *e Apoio para Implantação das Boas Práticas em Serviços de Nutrição e Dietética*  
798 *Hospitalar*. Rio de Janeiro: Rubio.
- 799
- 800 Teixeira, L. E. B., Santos, J. E. F., Moreira, I. S., Sousa, F. C., & Nunes, J. S. (2013).  
801 Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças comercializadas na cidade de  
802 Juazeiro do Norte – CE. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento*  
803 *Sustentável*, 8(3), 23-26.
- 804
- 805 Tondo, E. C., & Bartz, S. (2012). *Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança*  
806 *dos Alimentos*. Porto Alegre: Sulina.
- 807
- 808 Ukuku, D.O., Bari, M. L., Kawamoto, S., & Isshiki. K. (2005). Use of hydrogen  
809 peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer  
810 of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. *International*  
811 *Journal of Food Microbiology*, 104(2), 225-233.
- 812
- 813 Velázquez, L.C., Barbini, N. B., Escudero, M. E., Estrada, C. L., & Guzmán, A. M. S.  
814 (2009). Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for  
815 reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables.  
816 *Food Control*, 20(3), 262-268.
- 817
- 818 Venkitanarayanan, K. S., Lin, C., Bailey, H., & Doyle, M. P. (2002). Inactivation of  
819 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on  
820 apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. *Journal of*  
821 *Food Protection*, 65(1), 100-105.
- 822

- 823 Walker, E., Pritchard, C., & Forsythe, S. (2003). Food handlers' hygiene knowledge  
824 in small food businesses. *Food Control*, 14(5), 339-343.
- 825
- 826 Wang, X., Zhu, C., Xu, X., & Zhou, G. (2012). Real-time PCR with internal  
827 amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in  
828 food samples. *Food Control*, 25(1), 144-149.
- 829
- 830 Weissinger, W. R., Chantarapanont, W., & Beuchat, L. R. (2000). Survival and  
831 growth of *Salmonella* Baildon in shredded lettuce and diced tomatoes, and  
832 effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. *International Journal of Food*  
833 *Microbiology*, 62(1-2), 123-131.
- 834
- 835 Yarahmadi, M., Yunesian, M., Pourmand, M., Shahsavani, A., Mubedi, I., &  
836 Nomanpour, B. et al. (2012). Evaluating the efficiency of lettuce disinfection  
837 according to the official protocol in Iran. *Iranian Journal Public Health*, 41(3), 95-103.
- 838

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados desse estudo pode-se concluir que:

- As maiores médias na contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos das alfaces e dos tomates, foram constatadas nas amostras lavadas apenas com água;
- O hipoclorito de sódio em pó em relação à temperatura de exposição a 10°C foi o tratamento mais eficiente, mantendo a carga microbiana do alimento em níveis mais baixos;
- As maiores médias foram encontradas na temperatura de 30°C para as amostras de alface e tomate, independente do tratamento utilizado, faixa de temperatura é considerada crítica para o crescimento de micro-organismos aeróbios mesófilos;
- Na contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos nas amostras de tomate com casca, cenoura e beterraba descascadas as menores médias foram encontradas na temperatura de 10°C.
- Em relação ao NMP de termotolerantes e a presença de *Salmonella* ssp., constatou-se que todas as amostras avaliadas, independente do tempo e temperatura apresentaram-se dentro do limite permitido pela legislação sanitária vigente;
- Nenhuma das amostras avaliadas contatou-se *Staphylococcus* coagulase positiva;
- Independente da temperatura todas as amostras encontraram-se dentro dos limites aceitáveis exigidos pela legislação vigente, sugerindo que as

hortaliças podem ser expostas a uma temperatura ambiente maior do que traz as legislações do Brasil;

- Assim, para garantir a segurança do alimento em relação às temperaturas de distribuição exigidas pelas legislações outras recomendações devem ser testadas e validadas, assim como o presente estudo.
  
- Sugere-se também que outros estudos sejam realizados avaliando com outros alimentos a qualidade microbiológica em diferentes binômios de tempo e temperatura na distribuição com objetivo de garantir a qualidade higiênico-sanitária do alimento e a proteção da saúde do consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M. et al. Microbial quality of commercial 'Golden Delicious' apples throughout production and shelf-life in Lleida (Catalonia, Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 404-409, 2006.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 3a edition; 2008.

AKUTSU, R. C. et al. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 419-427, 2005.

ALLENDE, A. et al. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 12, p. 2514-2518, 2008.

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.

ANÔNIMO. Analysis of microbial hazards related to time/temperature control of foods for safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.33-41, 2003.

ANTONIOLLI, L. R. et al. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi "Pérola" minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 157-160, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15635: serviços de alimentação – requisitos de boas práticas higiênico-sanitárias e controles operacionais essenciais. 1. ed. Rio de Janeiro, 2008.

ARTES, F. et al. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 287-296, 2009.

BEHRENS, J. H. et al. Consumer purchase habits and views on food safety: A Brazilian study. **Food Control**, Vurrey, v. 21, n. 7, p. 963–969, 2010.



BERALDO, R. M; FARACHE FILHO, A. Bacteriological quality of irrigation water from vegetable gardens in the municipalities of Araraquara, Boa Esperança do Sul and Ibitinga, SP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 3, p. 345-350, 2011.

BERNARDON, R. et al. Construção de metodologia de capacitação em alimentação e nutrição para educadores. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 389-398, 2009.

BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes & Infection**, v. 4, p. 413-423, 2002.

BEUCHAT, L. R. et al. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruit and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1079-84, 2001.

BOURQUIN, L. **Recommendations for washing fresh produce. Michigan State University Extension**. 2008. Disponível em:  
<[http://www.canr.msu.edu/jakcson/Home\\_Ec/programs/hmec\\_food\\_washing.htm](http://www.canr.msu.edu/jakcson/Home_Ec/programs/hmec_food_washing.htm)>  
Acesso em: 20 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003, Seção 1, p. 4.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2013\***. Disponível em:  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10\\_passos\\_para\\_investigacao\\_surtos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001, Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de setembro de 2004. 15 set., 2004a.

BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde. **Avaliação do Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus no Brasil**. Brasília, 2004b. 64p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico**: Vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=3425](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=3425)> Acesso em: 10 de jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a População Brasileira – promovendo a alimentação saudável**. Brasília, 2006. 210p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 55, de 10 de novembro de 2009. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Produtos Saneantes Categorizados como Água Sanitária e Alvejantes à Base de Hipoclorito de Sódio ou Hipoclorito de Cálcio e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 de novembro de 2009, Seção 1.

BUZBY, J. C.; ROBERTS, T. The Economics of Enteric Infections: Human Foodborne Disease Costs. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1851–62, 2009.

CASTRO, I. R. R. et al. Vigilância de fatores de risco para doenças não transmissíveis entre adolescentes: a experiência da cAge do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 10, p. 2279-2288, 2008.

CASTRO, R. S. D. **Boas Práticas de Fabricação (BPF), análise de tomate e água em restaurantes da cidade de Botucatu-SP**. 2013. 95f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

CHESCA, A. C. et al. Refeições transportadas: importância do controle de temperatura. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 93-100, 2011.

COMMEAU, N.; JALOUSTRE, S. et al. Impact of temperature sampling strategy on the risk of *Clostridium* growth: Application to rapid cooling of food in institutional food service facilities. **Food Control**, Vurrey, v. 30, n. 2, p. 642-648, 2013.

DANELON, M. S.; SALAY, E. Perceived physical risk and risk-reducing strategies in the consumption of raw vegetable salads in restaurants. **Food Control**, Vurrey, v. 28, p. 412-419, 2012.

DING, T. et al. Risk assessment for *Listeria monocytogenes* on lettuce from farm to table in Korea. **Food Control**, v. 30, p. 190-199, 2013.

EVES, A.; DERVISI, P. (2005). Experiences of the implementation and operation of hazard analysis critical control points in the food service sector. **Hospitality Management**, v. 24, n. 1, p. 3-19, 2005.

FARIAS, J. C.; LOPES, A. S. Comportamentos de risco relacionados à saúde em adolescentes. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2004.

FAUSTINO, J. S. et al. Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000-2006. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 26-30, 2007.

FERNANDES, P. É. et al. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin. **Food Control**, Vurrey, v. 41, p. 21-26, 2014.

FONTANA, N. **Atividade antimicrobiana de desinfetantes utilizados na sanitização de alface**. 2006. 26f. Monografia (Graduação em Nutrição) - Centro Universitário Franciscano –Unifra, Santa Maria; 2006.

FORSYTHE, S. J. **The microbiology of safe food**, Second Edition, Chichester, United Kingdom, Wiley-Blackwell, 2010.

GELTING, R. et al. Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach. **Agricultural Water Management**, v. 98, n. 9, p. 1395-1402, 2011.

GERBA, C. P. The role of water and water testing in produce safety. In: X Fan, B. A. et al. (Eds.), **Microbial safety of fresh produce**. Wiley-Blackwell, 2009.

GERMANO, M.I.S. et al. Manipuladores de alimentos: Capacitar? E preciso. Regulamentar?...Será preciso???. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 78-79, p. 18-22, 2000.

GIL, M. I. et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 37-45, 2009.

GONÇALVES, N. A. et al. Consumo Alimentar de Adolescentes praticantes de canoagem. **Journal of Human Growth and Development**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2012.

GOODBURN, C.; WALLACE, C. A. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. **Food Control**, Vurrey, v. 32, p. 418-427, 2013.

GUPTA, N.; KHAN, D. K.; SANTRA, S. C. Prevalence of intestinal helminth eggs on vegetables grown in wastewater-irrigated areas of Titagarh, West Bengal, India. **Food Control**, Vurrey, v. 20, p. 942-945, 2009.

GURUDASANI, R.; SHETH, M. Food safety knowledge and attitude of consumers of various foodservice establishments. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 3, p. 364-380, 2009.

HAAPALA, I.; PROBART, C. Food safety knowledge, perceptions, and behaviors among middle school students. **Journal of nutrition education and behavior**, v. 36, n. 2, p. 71-76, 2004.

HOLVOET, K. et al. Insight into the prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in the fresh produce processing industry. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 4, p. 671-681, 2012.

HOLVOET, K. et al. Quantitative study of cross-contamination with *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, MS2 phage and murine norovirus in a simulated fresh-cut lettuce wash process. **Food Control**, Vurrey, v. 37, p. 218-227, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal. 2012. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.php?id\\_pesquisa=44](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=44)> Acesso em: 10 de jan. 2014.

ISSA-ZACHARIA, A. et al. Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non-thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. **Food Control**, Vurrey, v. 22, v. 4, p. 601-607, 2011.

JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Fruit and vegetable intake by Brazilian adults, 2003. **Cadernos de Saude Pública**, v. 21, p. S19-S24, 2005.

JALOUSTRE, S. et al. Modeling of *Clostridium perfringens* vegetative cell inactivation in beef-in-sauce products: a meta-analysis using mixed linear models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 1-2, p. 44-51, 2012.

JAY, J. **Microbiologia de alimentos**. Editora ArtMed, 6. ed., Porto Alegre, 2005.

JONES, T. F.; ANGULO, F. J. Eating in Restaurants: A Risk Factor for Foodborne Disease? **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 10, p. 1324-8, 2006.

KIM, S. J. et al. Temperature increase of foods in car trunk and the potential hazard for microbial growth. **Food Control**, Vurrey, v. 29, n. 1, p. 66-70, 2013.

KYLE, J. L. et al. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 exposed to lysates of lettuce leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1375-1387, 2010.

LEAL, G. V. da S. et al. Consumo alimentar e padrão de refeições de adolescentes, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, n. 3, p. 457-467, 2010.

LEVANTESI, C. et al. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 587-602. 2012.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F. et al. Crosscontamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during prewashing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. **Food Microbiology**, v.27, n.2, p.199-204, 2010.

LYNCH, M. F.; TAUXE, R. V.; HEDBERG, C. W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 307-315, 2009.

MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S; RAMOS, S. A. Avaliação do binômio tempo-temperatura de refeições transportadas. **Revista E-Scientia**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1, 2009.

MARONGWE, L. S. et al. An African success: the case of conservation agriculture in Zimbabwe. **International Journal of Agricultural Sustainability**, v. 9, n. 1, p. 153-161, 2011.

MARTINS, R. B.; HOGG, T.; OTERO, J. G. Food handlers' knowledge on food hygiene: The case of a catering company in Portugal. **Food Control**, Vurrey, v. 23, n. 1, p. 184-190, 2011.

MCGLYNN. **Guidelines for the use of chlorine bleach as a sanitizer in food processing operations**. 2010. Oklahoma Cooperative Extension, Oklahoma State University. Disponível em: <<http://osuextra.okstate.edu/pdfs/FAPC-116web.pdf>> Acesso em: 20 dez. 2013.

MEDEIROS, L. B.; et al. Diagnóstico das condições higiênicas de serviços de alimentação de acordo com a NBR 15635:2008. **Brazilian Journal of Food Technology**, IV SSA, p. 47-52, 2012.

MEDEIROS, L. B.; SACCOL, A. L. F. Avaliação de temperaturas em unidades de alimentação e nutrição de Caxias do Sul – RS. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 27, n. 218/219, 2013.

MOMESSO, A. P.; MATTÉ, M. H.; GERMANO, P. M. L. Avaliação das condições higiênico-sanitárias, por quilo, do município de São Paulo, durante o período de distribuição de refeições. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.136, p.81-9, 2005.

MONTICELLI, F. D. B.; SOUZA, J. M. P.; SOUZA, S. B. Consumo de frutas, legumes e verduras por escolares adolescentes. **Journal of Human Growth and Development**, v. 23, n. 3, p. 1-7, 2013.

MORELLI, E. et al. Performance and conditions of use of refrigerated display cabinets among producer/vendors of foodstuffs. **Food Control**, Vurrey, v. 26, n. 2, p. 363-368, 2012.

MOYNE, A. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in field-inoculated lettuce. **Food Microbiology**, n. 28, p. 1417-1425, 2011.

NASCIMENTO, A. R. et al. Sanitização de saladas in natura oferecidas em restaurantes *self-service* de São Luis, MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 92, p. 63-67, 2002.

NEUTZLING, M. B. et al. Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras em adultos de uma cidade no Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 11, p. 2365-2374, 2009.

NIEUWENHUIJSEN, M. J. Adverse reproductive health effects of exposure to chlorination disinfection by products. **Global NEST Journal**, v. 7, n. 1, p. 128-144, 2005.

NIEUWENHUIJSEN, M. J.; TOLEDANO, M. B.; ELLIOT, P. Uptake of chlorination disinfection by-products; a review and a discussion of its implications for exposure assessment in epidemiological studies. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v. 10, p. 586-599, 2000.

NOU, X. et al. Chlorine stabilizer T-128 enhances efficacy of chlorine against cross-contamination by *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in fresh-cut lettuce processing. **Journal Food Science**, v. 76, p. 218-224, 2011.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. 604p.

OLIVEIRA, M. et al. Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded 'Romaine' lettuce. **Food Microbiology**, v. 27, p. 375-380, 2010.

OLIVEIRA, A. B. A. de. et al. Comparison of different washing and disinfection protocols used by food services in southern Brazil for lettuce (*Lactuca sativa*). **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 1, p. 28-33, 2012a.

OLIVEIRA, M. et al. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 133-140, 2012b.

OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Antimicrobial resistance in *Salmonella Enteritidis* from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **The New Microbiologica**, v. 29, n. 1, p. 49-5, 2006.

OLIVEIRA, A. M. et al. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 114, p. 12-19. 2003.

OLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 686-693, 2009.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Doenças crônico degenerativas e obesidade: Estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde.** Brasília: OPAS; 2003.

ORNELLAS, L. H. **Técnica Dietética: seleção e preparo de alimentos.** 8. ed., São Paulo: Atheneu, 2007. 276 p.

ORUE, N. et al. Decontamination of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* O157:H7 from leafy green vegetables using edible plant extracts. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 2, p. M290-M296, 2013.

OSIMANI, A. et al. An eight-year report on the implementation of HACCP in a university canteen: impact on the microbiological quality of meals. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 21, n. 2, p. 120-132, 2011.

PÉREZ-GREGORIO, M. R. et al. Comparison of sanitizing technologies on the quality appearance and antioxidant levels in onion slices. **Food Control**, Vurrey, v. 22, n. 12, p. 2052-2058, 2011.

POUMEYROL, E. et al. Impact of the method chosen for measuring temperatures on the efficacy of rapid cooling of foods in catering facilities. **Food Control**, Vurrey, v. 23, n. 2, p. 345-350, 2012.

PROENÇA, R. P. C. et al. **Qualidade nutricional e sensorial na produção de refeições.** Florianópolis: Ed. UFSC. 2005.

RI, D. D. et al. Temperatura dos equipamentos e dos alimentos durante a distribuição em um restaurante de Santa Maria. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 139-145, 2011.

RICO, D. et al. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 7, p. 373-386, 2007.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Portaria nº 78 de janeiro de 2009. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 30 jan. 2009.



RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatórios Anuais de DTA**. Porto Alegre, 2008.

RODRIGUES, K.R.M.; SALAY, E. Food safety control in in-house and outsourced food services and fresh vegetable suppliers. **Food Control**, Vurrey, v. 25, n. 2, p. 767-772, 2012.

ROLLS, B. J.; ELLO-MARTIN, J. A.; TOHILL, B. C. What can intervention studies tell us about the relationship between fruit and vegetable consumption and weight management. **Nutrition Reviews**, v. 62, n. 1, p. 1-17, 2004.

ROSA, C. C. B.; MARTINS, M. L. L.; FOLLY, M. M. Avaliação microbiológica de hortaliças provenientes de hortas comunitárias de Campos dos Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 134, p. 75-80, 2007.

SACCOL, A. L. F. et al. Avaliação das Boas Práticas em duas visões: técnica e da empresa. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, n.4, p.19-23, 2009.

SAFE FOOD AUSTRALIA. A Guide to the Food Safety Standards. Austrália, 2nd Edition, January 2001. Disponível em: <<http://www.foodstandards.gov.au/>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

SANTOS, T. B. A. et al. Condições higiênico-sanitárias de alfaces antes e após tratamento com agente antibacteriano. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 121, p. 85-89, 2004.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Sanitária. **Portaria nº. 2619**, de 06 de dezembro de 2011. Regulamento de Boas Práticas e de Controle de condições sanitárias e técnicas das atividades relacionadas à importação, exportação, extração, produção, manipulação, beneficiamento, acondicionamento, transporte, armazenamento, distribuição, embalagem, reembalagem, fracionamento, comercialização e uso de alimentos, águas minerais e de fontes, bebidas, aditivos e embalagens para alimentos. São Paulo, SP, 2011.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Sanitária. **Portaria CVS nº. 05**, de 09 de abril de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo. São Paulo, SP, 2013.

SCALLAN, E.; MAHON, B. E. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) in 2012: A Foundation for Food Safety in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. S5, p. 381–384, 2012.

SCOTTISH STATUTORY INSTRUMENTS. The food hygiene regulations. Scotland, n. 3, 2006. Disponível em: <<http://www.legislation.gov.uk/ssi/2006/3/contents/made>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

SELMA, M. V. et al. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. **Food Microbiology**, v. 25, p. 162-168, 2008.

SEO, S. et al. Microbiological analysis of cooked bean sprout salad consumed in Korea. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 3, p. 753–767, 2010.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 23, p. 167-173, 2004.

SILVA JÚNIOR, E. A. da. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 7. ed. São Paulo: Varela, 2012.

SMITH DE WAAL, C.; BHUIYA, F. Outbreaks by the numbers: Fruits and vegetables 1990-2005. The Centre for Science in the Public Interest. 2009. Disponível em: <<http://www.cspinet.org/foodsafety/IAFPPoster.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

SOUZA, E. L.; SILVA, C. . Qualidade sanitária de equipamentos, superfícies, água e mãos de manipuladores de alguns estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de João Pessoa, PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116, p. 98-102, 2004.

STANGARLIN, L. **Avaliação das condições de qualidade em serviços de alimentação e unidades hospitalares na cidade de Santa Maria, RS**. 2008. 190f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

STANGARLIN, L et al. **Instrumentos e Apoio para Implantação das Boas Práticas em Serviços de Nutrição e Dietética Hospitalar**. Rio de Janeiro: Rubio; 2013.

STATUTORY INSTRUMENTS. The food hygiene regulations. England, n.14, 2006. Disponível em: <<http://www.legislation.gov.uk/uksi/2006/14/contents/made>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

STATUTORY INSTRUMENTS. The food hygiene regulations. Wales, n.31, 2006. Disponível em: <[http://www.legislation.gov.uk/wsi/2006/31/pdfs/wsi\\_20060031\\_mi.pdf](http://www.legislation.gov.uk/wsi/2006/31/pdfs/wsi_20060031_mi.pdf)>. Acesso em: 14 nov. 2013.

STATUTORY RULES OF NORTHERN IRELAND. The food hygiene regulations. Northern Ireland, n. 3, 2006. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/northern-ireland/niregulation/regulationsni/foodhygNI>> Acesso em: 14 nov. 2013.

STOPFORTH, J. D. et al. Effect of acidified sodium chlorite, chlorine, and acidic electrolyzed water on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* inoculated onto leafy greens. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 3, p. 625-628, 2008.

TAUXE, R. V. et al. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S16–S28, 2010.

TAYLOR, E. HACCP in small companies: benefit or burden? **Food Control**, Vurrey, v. 12, n. 4, p. 217-222, 2001.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança dos Alimentos**. Porto Alegre: Sulina; 2012.

TORAL, N. et al. Comportamento alimentar de adolescentes em relação ao consumo de frutas e verduras. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 331-340, 2006.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food Code. United States, 2009. Disponível em: <<http://www.ntis.gov/products/food-code>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

VAN DUYN, M.A.; PIVONKA, E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 100, n. 12, p. 1511-1521, 2000.

VAN HAUTE, S. et al. Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 2850-2861, 2013.

VENTIMIGLIA, T. de M.; BASSO, C. Tempo e temperatura na distribuição de preparações em uma unidade de alimentação e nutrição. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 109-114, 2008.

XIMENES, R. et al. Hábitos alimentares em uma população de adolescentes. **Odontologia Clínica Científica**, Recife, v. 5, n. 4, p. 287-292, 2006.

WATERS, B. W.; HUNG, Y. Evaluation of different methods for determination of properties of chlorine-based Sanitizers. **Food Control**, Vurrey, v. 30, p. 41-47, 2013.

WHO-Europe. Nutrition, food safety and food security. Food security monitoring system (FSMS). 2011. Disponível em: <<http://www.euro.WHO.int/en/where-we-work/member-states/tajikistan/areas-of-work/nutrition,-food-safety-and-food-secuty>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

WHO. World Health Organization. Diet nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: World Health Organization; 2002. (WHO Technical Report Series, 916).

WHO. World Health Organization. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Geneva: WHO; 2003.

YANG, H.; FEIRTAG, J.; DIEZ-GONZALEZ, F. Sanitizing effectiveness of commercial “active water” technologies on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Vurrey, v. 33, p. 232-238, 2013.

ZHANG, G. D. et al. Efficacy of antimicrobial agents in lettuce leaf processing water for control of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1392-1397, 2009.

ZWIETERING, M. H.; STEWART, C. M.; WHITING, R. C. Validation of control measures in a food chain using the FSO concept. **Food Control**, Vurrey, v. 21, n. 12, p. 1716-1722, 2010.

**ANEXO**

## **ANEXO A –Guide of authors – Periódico Food Control**

### **Introduction**

*Food Control* is an international journal that provides essential information for those involved in food safety and process control.

*Food Control* covers: Microbial food safety and antimicrobial systems, Mycotoxins Hazard analysis, HACCP and food safety objectives, Risk assessment, including microbial risk assessment, Quality assurance and control, Good manufacturing practices, Food process systems design and control, Food Packaging Rapid methods of analysis and detection, including sensor technology Environmental control and safety Codes of practice, legislation and international harmonization, Consumer issues, Education, training and research needs.

The scope of *Food Control* is comprehensive and includes original research papers, authoritative reviews, short communications, comment articles that report on new developments in food control, and position papers.

The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication.

### **Types of paper**

Original high-quality research papers (preferably no more than 7000 words, including tables and illustrations).

Major review articles, up to 10,000 words Short communications of up to 3000 words (not including references), describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

Short reviews on topical subjects, up to 6000 words.

Comment articles not exceeding 2000 words. Authoritative position papers from expert groups are also welcome.

*Food Control* also publishes book reviews, Letters to the Editor, conference reports and a calendar of forthcoming events.

The Editor-in-Chief has the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) of insufficient novelty for a wide international readership; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

All contributions deemed suitable for review are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referees' reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

### **Contact details for submission**

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article.

Via the homepage of this journal <http://ees.elsevier.com/foodcont> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files.

## **BEFORE YOU BEGIN**

### ***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

### ***Conflict of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### ***Changes to authorship***

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### ***Copyright***

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

#### *For Subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including

compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *For Open Access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

#### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### **Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

##### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses

**Creative Commons Attribution (CC BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data



mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

### ***Referees***

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### ***Use of word processing software***

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Every page of the manuscript should be numbered. Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript, not per page.

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

**Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

**Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

**Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

**Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Chemical compounds**

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below: Chemical compounds studied in this article  
Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865). More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

**Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

**Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

**Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### ***Database linking***

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### ***Math formulae***

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

#### ***Mathematical and technical settings***

Use the appropriate number of significant figures to express your data - they should be justifiable and reflect the necessary level of accuracy of the method. A normal maximum should be 3 - e.g. 37.1, 2.53). Detailed mathematical discussion should be placed in an appendix. Equations and formulae should be typewritten. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page. Special symbols should be identified in the margin, and the meaning of all symbols should be explained in the text where they first occur. If you use several symbols, a list of definitions (not necessarily for publication) will help the editor. Type mathematical equations exactly as they should appear in print. Journal style for letter symbols is as follows: italic (indicated by underlining); constants, roman type; matrices and vectors, bold type (indicated by wavy underlining).

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature maybe used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

*Table footnotes* Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### ***Artwork***

#### ***Electronic artwork***

##### ***General points***

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

#### *Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. *List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book: Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***AudioSlides***

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### ***Supplementary data***

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### ***Interactive Phylogenetic Trees***

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. For more information please see <http://www.elsevier.com/phylogenetictrees>.

### ***Submission checklist***

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### ***Online proof correction***

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>).



Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.