

**INSTITUTO FEDERAL
DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
Rio de Janeiro

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Campus Rio de Janeiro

Juliana Souza Alves

**BACTÉRIAS ISOLADAS DE ALFACES MINIMAMENTE PROCESSADAS
COMERCIALIZADAS EM NITERÓI/RJ:**

Perfil de resistência a antibióticos e a hipoclorito de sódio

Rio de Janeiro – RJ
2019

Juliana Souza Alves

**BACTÉRIAS ISOLADAS DE ALFACES MINIMAMENTE PROCESSADAS
COMERCIALIZADAS EM NITERÓI/RJ:**

Perfil de resistência a antibióticos e a hipoclorito de sódio

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - *Campus* Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadoras: Prof^ª Dr^ª Barbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira

Prof^ª Dr^ª Aline dos Santos Garcia Gomes

Rio de Janeiro – RJ
2019

Juliana Souza Alves

**BACTÉRIAS ISOLADAS DE ALFACES MINIMAMENTE PROCESSADAS
COMERCIALIZADAS EM NITERÓI/RJ:**

Perfil de resistência a antibióticos e a hipoclorito de sódio

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - *Campus* Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data de aprovação: 29 de julho de 2019.

Prof. Dr^a Barbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof. Dr^a Aline dos Santos Garcia Gomes
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof. Dr^a Janaina dos Santos Nascimento
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof. Dr^a Alice Goncalves Martins Gonzalez
Universidade Federal Fluminense – UFF

Rio de Janeiro – RJ
2019

Dedico ao meu Deus, que me conduz os passos com sua soberania e grandioso amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me direcionar, me fortalecer, me inspirar e renovar as minhas forças sempre que necessário;

Ao meu marido, meu companheiro e grande incentivador, que sonha junto comigo os meus sonhos e sempre acredita que posso ir além;

Aos meus filhos, Julia e Miguel, pela compreensão e por viverem tão intensamente comigo esta trajetória; quero sempre ser inspiração para vocês;

À minha sogra, minha mãe, tia, cunhada e sobrinha, que tantas vezes cuidaram dos meus filhos para que eu pudesse ter mais tempo pra me dedicar à pesquisa;

Às minhas orientadoras Barbara Dias e Aline Gomes, pelo carinho, apoio, paciência e conhecimento compartilhado, que foram fundamentais no desenvolvimento e concretização desta pesquisa;

Aos professores Dra. Janaina Nascimento, Dra. Hilana Ceotto e Dr. Leonardo Oliveira por aceitarem o convite para integrarem a banca de qualificação e pelas sugestões valiosas que contribuíram para o enriquecimento deste estudo;

Ao IFRJ, pela oportunidade, de retornar à antiga ETFQ-RJ, e ainda aprender tanto;

Aos monitores do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IFRJ e à Bruna, pela paciência e solicitude;

Ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela parceria no uso do Maldi Biotyper e, especialmente à Larissa, pela atenção e ensinamentos;

À coordenação do Laboratório de Química Quantitativa do IFRJ, pela autorização no uso do laboratório para realização da titulação iodométrica e, especialmente, ao Gabriel, pela atenção e solicitude;

A todos que, mesmo indiretamente, contribuíram para chegada até aqui.

Muito obrigada!

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”*

Carl Gustav Jung

RESUMO

Diante da crescente tendência pela busca por uma alimentação mais saudável e, ao mesmo tempo, por maior praticidade no preparo das refeições, os vegetais minimamente processados, unindo saudabilidade e conveniência, apresentam-se como uma alternativa ao anseio do consumidor. No entanto, diversos relatos correlacionam estes produtos como importantes veículos de transmissão de patógenos, sobretudo pelo fato de já se apresentarem prontos para o consumo. Estes produtos ainda podem atuar como reservatórios e transportadores de bactérias resistentes a antibióticos, disseminando esta resistência pela cadeia alimentar, carreando-a da fazenda para os consumidores, o que constitui uma preocupação para a segurança de alimentos. Para eliminação de microrganismos no processamento mínimo são utilizadas as tecnologias de obstáculos e, entre elas, a sanitização, cujo agente mais utilizado é o hipoclorito de sódio. Estudos, entretanto, têm relatado inúmeros isolados bacterianos evidenciando também resistência ao cloro, o que pode contribuir para a redução da vida útil dos produtos, envolvimento deles em surtos de origem alimentar e ainda, microrganismos estressados ou danificados subletalmente, sendo, como consequência, induzidos à resistência a antibióticos. Este estudo teve como objetivo caracterizar bactérias isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ, quanto à sensibilidade a antibióticos e a hipoclorito de sódio, verificando a existência de correlação entre ambas. Para isso, no período de Maio a Dezembro de 2018, 13 amostras de alfaces minimamente processadas, de diferentes variedades, foram coletadas de três diferentes mercados locais e analisadas quanto à contagem de aeróbios mesófilos e pesquisa de coliformes e Salmonella, conforme metodologia clássica. Os isolados foram identificados por Maldi-Tof e testados quanto à sensibilidade a antibióticos por disco-difusão e quanto ao hipoclorito de sódio pelo método de suspensão, adaptado para microtitulação. As alfaces minimamente processadas analisadas neste estudo apresentaram contagens de aeróbios mesófilos entre 4,60 e 7,48 log UFC/g, revelando necessidade de maior vigilância quanto ao controle de temperatura na cadeia produtiva. As espécies predominantemente isoladas foram *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*. Piperaciclina + Tazobactam, Tetraciclina, Cefuroxima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina e Trobramicina foram eficazes contra todas os isolados de enterobactérias. Piperaciclina + Tazobactam, Ceftazidima, Cefepime, Ciprofloxacina, Imipenem e Trobramicina foram eficazes contra todos os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. Trobramicina não foi eficaz contra nenhum dos isolados de *Acinetobacter sp*. Multirresistência antimicrobiana foi evidenciada por espécies de *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter braakii* e *Acinetobacter johnsonii*. O binômio concentração de cloro ativo x tempo de contato eficaz contra todos os isolados foi 200 ppm por 20 minutos. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que as alfaces minimamente processadas analisadas se caracterizam pela presença de isolados bacterianos de Enterobacteriaceae e *Acinetobacter sp*. com elevada correlação entre a resistência ao hipoclorito de sódio e aos antibióticos testados, entretanto, a mesma correlação não foi verificada entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: alface, minimamente processados, antibióticos, hipoclorito de sódio, resistência cruzada.

ABSTRACT

Facing the growing tendency to searching for a healthier diet and, at the same time, for greater convenience in preparing meals, minimally processed vegetables, combining healthiness and convenience, are presented as an alternative to consumer desire. However, several reports correlate these products as important pathogen transmission vehicles, mainly because they are already ready to eat. These products can still act as reservoirs and carriers of antibiotic resistant bacteria, spreading this resistance throughout the food chain and carrying it from the farm to consumers, which is a concern for food safety. For the elimination of microorganisms in minimal processing, hurdle technologies are used, and among them, sanitization, whose most used agent is sodium hypochlorite. Studies, however, have reported numerous bacterial isolates also showing resistance to chlorine, which may contribute to reducing the shelf life of products, to their involvement in foodborne outbreaks, and result in stressed or sublethally damaged microorganisms, and, as a consequence, induced resistance to antibiotics. This study aimed to characterize bacteria isolated from minimally processed lettuces commercialized in Niterói / RJ, as for the sensitivity to antibiotics and sodium hypochlorite, verifying the existence of correlation of them. For this purpose, from May to December 2018, 13 samples of minimally processed lettuce of different varieties, were collected from three different local markets and analyzed for mesophilic aerobic count and coliform and Salmonella research, according by the classical methodology. The isolates were identified by Maldi-Tof and tested for antibiotic sensitivity by disc diffusion method and for sodium hypochlorite resistance by the suspension method, adapted to microtiter. The minimally processed lettuces analyzed in this study showed mesophilic aerobic counts between 4.60 and 7.48 log CFU / g, revealing the need for greater vigilance regarding temperature control in the production chain. Predominantly isolated species were *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. Piperacycline + Tazobactam, Tetracycline, Cefuroxime, Ceftazidime, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Gentamycin and Trobramycin were effective against all enterobacterial isolates. Piperacycline + Tazobactam, Ceftazidime, Cefepime, Ciprofloxacin, Imipenem and Trobramycin were effective against all *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Trobramycin was not effective against any of the *Acinetobacter sp.* Antimicrobial multidrug resistance was evidenced by species of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter braakii* and *Acinetobacter johnsonii*. The binomial active chlorine concentration x contact time effective against all isolates was 200 ppm for 20 minutes. Given the results obtained, it was concluded that the minimally processed lettuces analyzed are characterized by the presence of bacterial isolates of Enterobacteriaceae and *Acinetobacter sp.* with high correlation between resistance to sodium hypochlorite and the tested antibiotics, however, the same correlation was not observed in *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

Keywords: lettuce, minimally processed, antibiotics, sodium hypochlorite, cross resistance.

ABREVIATURAS

AMC	Amoxicilina + Ác. Clavulânico
AMP	Ampicilina
APS	Ampicilina + Subactam
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPM	Cefepime
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxima
EC	<i>E. coli</i>
ERT	Ertapenem
GEN	Gentamicina
HUS	Síndrome hemolítico-urêmica
IFRJ	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
IPM	Imipenem
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MP	Minimamente processadas
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Ágar Padrão para Contagem
PIT	Piperaciclina + Tazobactam
PNSQV	Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal
PVC	Policloreto de vinila

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SUT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
TET	Tetraciclina
TOB	Tobramicina
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VRBL	Ágar Vermelho Violeta Bile com Lactose

FIGURAS

Figura 1	Fluxograma da produção de alfaces minimamente processadas	18
Figura 2	Recepção e conferência de matéria-prima	19
Figura 3	Matéria-prima adequada (a) e inadequada (b) para o processamento mínimo	19
Figura 4	Seleção de matéria-prima e pré-lavagem manuais	20
Figura 5	Lavagem com sistema de tambor rotativo	21
Figura 6	Imagem representativa do processo de sanitização	22
Figura 7	Abastecimento manual da centrífuga com alfaces para etapa de centrifugação	22
Figura 8	Acondicionamentos (a) manual e (b) automatizado.	24
Figura 9	Armazenamento refrigerado.	24
Figura 10	Caminhão refrigerado utilizado para o transporte de hortaliças minimamente processadas.	25
Figura 11	Comercialização de hortaliças minimamente processadas em gôndolas refrigeradas.	25
Figura 12	Amostras (a) alface roxa (b) alface crespa e (c) alface lisa	32
Figura 13	Embalagem de alface crespa aberta para pesagem	33
Figura 14	Procedimento simplificado da identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF	35
Figura 15	Coloração da (a) azul escura do complexo amido-I3 desaparece, gerando uma (b) solução incolor.	39
Figura 16	Esquema das microplacas utilizadas para contato dos isolados com o hipoclorito de sódio nas concentrações 200 ppm, 100 ppm e 50 ppm.	40
Figura 17	Esquema das microplacas utilizadas para incubação após os tempos de contato com as variadas concentrações	41

GRÁFICOS

Gráfico 1	Prevalência de gêneros bacterianos isolados de alfaces MP comercializadas em Niterói/RJ	44
Gráfico 2	Espécies bacterianas isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ	45

TABELAS

Tabela 1	Padrão microbiológico sanitário para alfaces minimamente processadas	27
Tabela 2	Descrição das amostras de alface minimamente processadas	31
Tabela 3	Interpretação dos valores de pontuação obtidos por MALDI-TOF	36
Tabela 4	Antibióticos empregados no estudo	37
Tabela 5	População de aeróbios mesófilos presentes em alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	42
Tabela 6	Distribuição das espécies bacterianas isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	47
Tabela 7	Perfil de resistência e multirresistência antimicrobiana de enterobactérias isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	49
Tabela 8	Perfil de susceptibilidade das <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ	50
Tabela 9	Perfil de sensibilidade antimicrobiana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ	52
Tabela 10	Perfil de sensibilidade antimicrobiana de <i>Acinetobacter sp.</i> isolados de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ	52
Tabela 11	Volumes de titulante consumidos na titulação iodométrica	53
Tabela 12	Perfil de susceptibilidade ao hipoclorito de sódio de enterobactérias isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	55
Tabela 13	Perfil de susceptibilidade ao hipoclorito de sódio de <i>Pseudomonas sp</i> isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	56
Tabela 14	Perfil de susceptibilidade ao hipoclorito de sódio de <i>Acinetobacter sp</i> isolados de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	56
Tabela 15	Correlação do perfil de resistência a antibióticos e a hipoclorito de sódio de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	58
Tabela 16	Correlação do perfil de resistência a antibióticos e a hipoclorito de sódio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	61
Tabela 17	Correlação do perfil de resistência a antibióticos e hipoclorito de sódio de <i>Acinetobacter sp</i> isolados de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS	17
2.2 ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA	17
2.3 CONTAMINAÇÃO DE ALFACES MINIMAMENTE PROCESSADAS	26
2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	27
2.5 HIPOCLORITO DE SÓDIO COMO SANITIZANTE DE ALFACES MINIMAMENTE PROCESSADAS	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 AMOSTRAGEM	31
4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	32
4.3 CONTAGEM DE AERÓBIOS MESÓFILOS	33
4.4 PESQUISA DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES	33
4.5 PESQUISA DE <i>Salmonella</i>	34
4.6 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS	34
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS	35
4.8 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	36
4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO	37
4.9.1 Determinação do teor de cloro ativo na água sanitária comercial utilizada para preparo da solução de hipoclorito de sódio	37
4.9.1.1 Preparo da amostra	38
4.9.1.2 Titulação	38
4.9.2 Preparo da solução estoque de hipoclorito de sódio	39
4.9.3 Teste de suspensão bacteriana	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 AERÓBIOS MESÓFILOS	42
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	43
5.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	48
5.3.1 Perfil de sensibilidade a antibióticos de <i>Enterobacteriaceae</i>	48

5.3.2 Perfil de sensibilidade a antibióticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
5.3.3 Perfil de sensibilidade a antibióticos de <i>Acinetobacter sp</i>	51
5.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO	53
5.4.1 Determinação do teor de cloro ativo na água sanitária comercial utilizada para preparo da solução de hipoclorito de sódio	53
5.4.2 Perfil de sensibilidade ao hipoclorito de sódio de <i>Enterobacteriaceae</i>	54
5.4.3 Perfil de sensibilidade ao hipoclorito de sódio de <i>Pseudomonas sp</i>	54
5.4.4 Perfil de sensibilidade ao hipoclorito de sódio de <i>Acinetobacter sp</i>	55
5.5 CORRELAÇÃO DOS PERFIS DE SENSIBILIDADE DE ANTIBIÓTICOS E HIPOCLORITO DE SÓDIO	55
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Há uma crescente tendência na busca por uma alimentação mais saudável. As diretrizes alimentares da maioria dos países consagraram o conceito de que uma dieta saudável deve conter uma combinação equilibrada de carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais. O atual Guia Alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2014), propõe que a base da alimentação seja constituída de alimentos *in natura* e/ou minimamente processados, em grande variedade e de origem predominantemente vegetal. A recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) é de que sejam ingeridos diariamente, pelo menos, 400 g de frutas e vegetais (WHO, 2017a)

Além da busca por uma alimentação mais saudável, há também a busca por maior praticidade no preparo das refeições em virtude da falta de tempo, consequência de um ritmo de vida cada vez mais acelerado. Os vegetais minimamente processados, unindo saudabilidade e conveniência, são uma alternativa ao anseio do consumidor.

A venda de vegetais minimamente processados teve um aumento significativo. Segundo Berbari, Paschoalino e Silveira (2001), esse aumento se justifica, principalmente, pela praticidade que eles apresentam. Para Carnelossi e colaboradores (2002) outro fator importante é a redução do tempo disponível para elaborar refeições e a crescente tendência dos consumidores em buscarem alimentos saudáveis, frescos e de alta qualidade.

O Relatório de Estudo de Mercado de Hortaliças Minimamente Processadas - SEBRAE/ESPM de setembro de 2008, acrescenta ainda que o surgimento das hortaliças minimamente processadas se deu principalmente devido a fatores psicológicos, sociais e econômicos que condicionam uma nova forma de vida e busca pela felicidade. Este mesmo relatório define o surgimento das hortaliças minimamente processadas como “um dos capítulos mais atuais e significativos da história da alimentação humana e da própria história da oferta de alimentos na economia de mercado” (SEBRAE, 2008).

A principal hortaliça folhosa consumida no Brasil é a alface (*Lactuca sativa*) (SALA e COSTA, 2012). Seu processamento mínimo compreende as etapas de recepção de matéria-prima, seleção, pré-lavagem, corte, lavagem e sanificação, centrifugação, acondicionamento, selagem, etiquetagem, embalagem secundário, armazenamento e distribuição (EMBRAPA, 2004).

A Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 65 de 9 de setembro de 2003, afirma a necessidade de controle de qualidade dos vegetais minimamente processados pelo fato de serem produtos para consumo direto e com maior capacidade de deterioração, em virtude dos danos mecânicos provocados pelo processo.

Nos Estados Unidos diversos surtos alimentares foram associados ao consumo de alface. O mais recente, ocorrido em 2018, foi um surto associado ao consumo de alface romana contaminada por *E. coli* O157:H7, quando 210 pessoas foram infectadas em 36 estados diferentes, resultando em 96 internações, 27 casos de síndrome hemolítico-urêmica (HUS) e 5 mortes (CDC, 2018).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, entre os anos 2000 e 2017, a região Sudeste, foi a região de maior incidência de surtos alimentares. Neste mesmo período, dos surtos em que houve identificação do agente etiológico, as bactérias foram responsáveis por 92,2% dos casos. *Salmonella* e *Escherichia coli* foram os principais agentes etiológicos. (BRASIL, 2018).

Assim, este estudo visa contribuir com dados sobre as condições higiênico-sanitárias das alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói, no estado do Rio de Janeiro, Brasil, bem como revelar seu perfil bacteriano quanto à sensibilidade a antibióticos e ao sanitizante preconizado para higienização de hortifrutícolas (hipoclorito de sódio).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS

A Instrução Normativa SDA/MAPA nº 65 de 09/09/2003, que aprova as Diretrizes Gerais do Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal (PNSQV), define produtos vegetais minimamente processados como "frutas ou hortaliças, ou combinação destas, que apresentam alteração apenas física, mantendo o estado fresco e natural" (BRASIL, 2003).

A proposta deste tipo de alimento é viabilizar o preparo de refeições de forma fácil e rápida, apresentando como vantagens, além da conveniência, o fornecimento de um produto semelhante, ou muito próximo, ao fresco, com características nutritivas e sensoriais preservadas (BANSAL *et al.*, 2015). Além disso, contribui com a redução da produção de lixo doméstico, porque são comercializados previamente lavados, cortados e limpos (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Como limitações, estes produtos apresentam o custo mais elevado, maior perecibilidade, em relação aos produtos *in natura* e desconfiança de alguns consumidores em relação à qualidade, procedência e veracidade das informações apresentadas (OLIVEIRA e SANTOS, 2015).

2.2 ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA

A tendência observada hoje no Brasil, já comum na Europa e Estados Unidos, é o aumento do consumo de hortaliças folhosas processadas e embaladas. A alface (*Lactuca sativa* L.) é a principal hortaliça folhosa consumida no Brasil (SALA e COSTA, 2012).

O processamento mínimo de alface é descrito pela EMBRAPA em seu Manual de Segurança e Qualidade na Produção de Alface Minimamente Processada (2004), como apresentado na Figura 1.

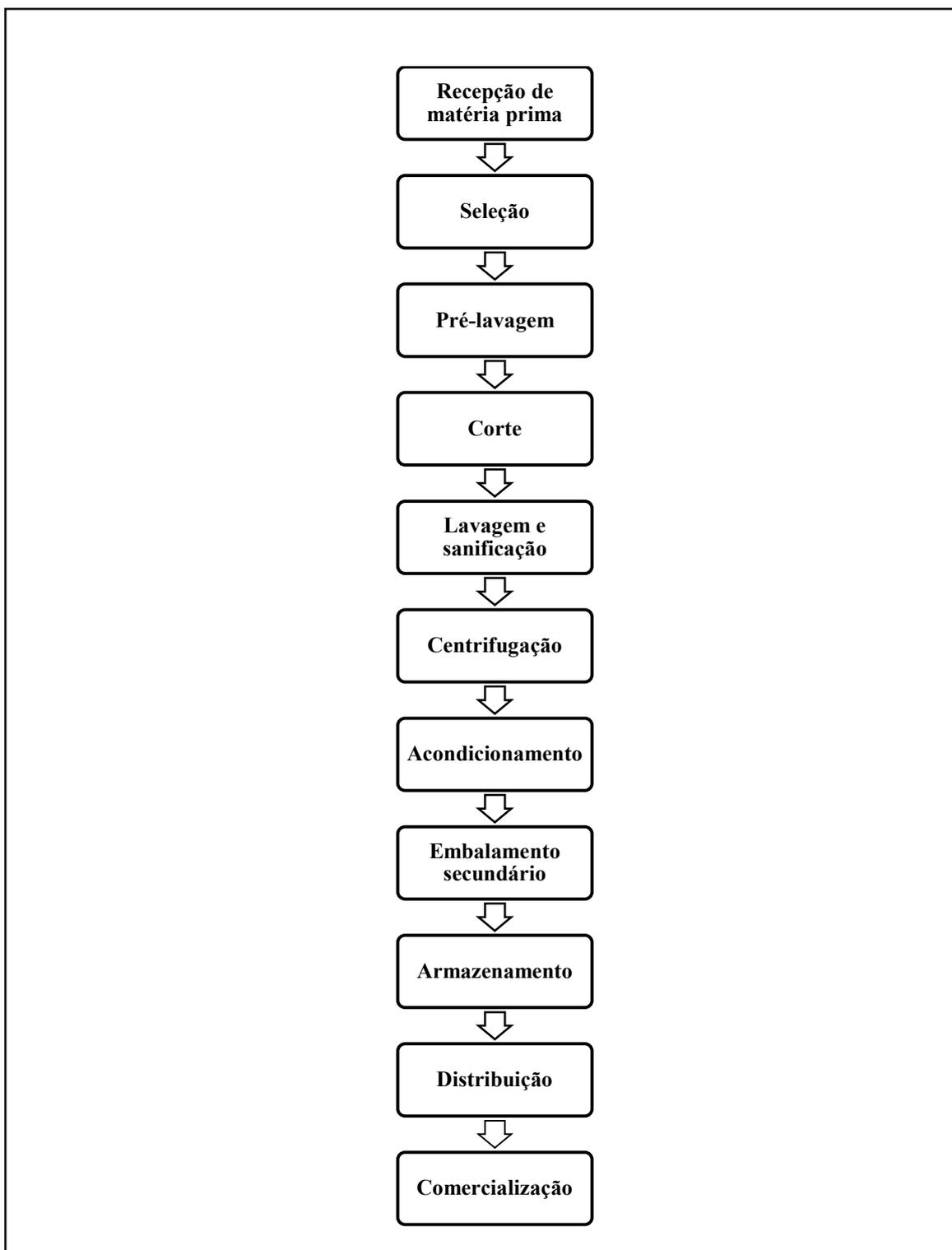


Figura 1. Fluxograma da produção de alfaces minimamente processadas

Fonte: Adaptada de EMBRAPA, 2004

A produção se inicia com a recepção de matéria-prima, etapa em que ocorre a inspeção da qualidade (Figura 2) e, caso seja verificada a presença de características indesejáveis, como danos mecânicos, danos por insetos, doenças ou coloração inadequada, a matéria-prima é rejeitada (Figura 3) (EMBRAPA, 2004; OLIVEIRA e SANTOS, 2015).



Figura 2. Recepção e conferência de matéria-prima.

Fonte: EMBRAPA, 2011

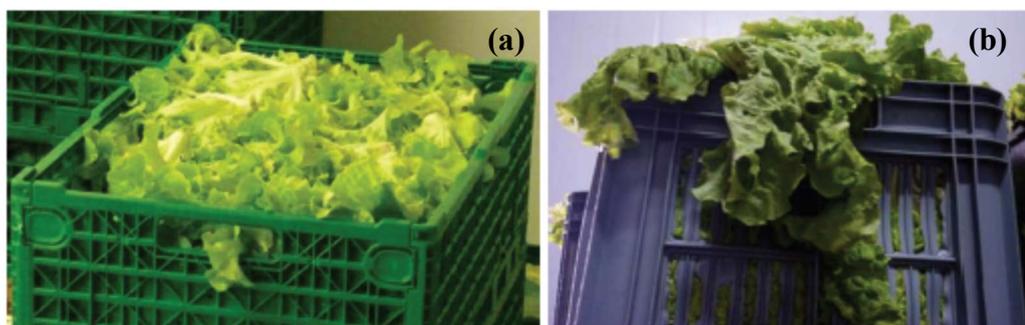


Figura 3. Matéria-prima adequada (a) e inadequada (b) para o processamento mínimo

Fonte: EMBRAPA, 2011

Na etapa de seleção, (Figura 4) ocorre o descarte das folhas externas com o objetivo de uniformização e padronização do produto final (EMBRAPA, 2004; OLIVEIRA e SANTOS, 2015) e redução da contaminação em virtude de sua proximidade com o solo (OLIVEIRA e SANTOS, 2015).

A pré-lavagem, que tem como objetivo a remover sujidades aderidas à superfície das folhas e promover o pré-resfriamento das mesmas (Figura 4), ocorre a imersão da matéria-prima

em água potável à baixa temperatura (5 a 10 °C) (EMBRAPA, 2004; OLIVEIRA e SANTOS, 2015, KLUGE, 2016). O resfriamento rápido, por ser um método econômico, eficaz e simples é o mais utilizado para hortaliças destinadas ao processamento mínimo (KLUGE, 2016), mas o mesmo também pode se dar em câmaras frias (OLIVEIRA e SANTOS, 2015).



Figura 4. Seleção de matéria-prima e pré-lavagem manuais

Fonte: EMBRAPA, 2011

Após a etapa de pré-lavagem, segue-se a etapa de corte das alfaces. Este, deve ser realizado em alta velocidade, utilizando sistemas de lâminas sempre afiadas para maior precisão e redução das injúrias mecânicas no tecido vegetal dessa hortaliça. As injúrias mecânicas aceleram a respiração celular, liberam enzimas e exsudatos do interior das células vegetais causando a degradação do tecido e oxidações enzimáticas (EMBRAPA, 2004; OLIVEIRA e SANTOS, 2015). Este processo, que reduz a qualidade e vida útil do produto, é denominado escurecimento enzimático e é catalisado pela ação da polifenol oxidase sobre compostos fenólicos resultando na produção de polímeros de coloração marrom (MAISTRO, 2001; MATTOS *et al.*, 2007). Pela sua elevada sensibilidade ao escurecimento enzimático a alface é uma das hortaliças mais estudadas (MATTOS *et al.*, 2007).

Posteriormente, o processo de lavagem (Figura 5) ocorre em água à temperatura de 5 °C para remover resíduos remanescentes e possíveis contaminações oriundas da manipulação (EMBRAPA, 2004; OLIVEIRA e SANTOS, 2015).



Figura 5. Lavagem com sistema de tambor rotativo

Fonte: EMBRAPA, 2011

Para sanitização (Figura 6), a fim de reduzir a contaminação bacteriana, o sanitizante amplamente utilizado é o hipoclorito de sódio (OSAILI *et al.* 2018).

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 14, de 28 de fevereiro de 2007, que aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul, define sanitizante como “um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde”.

A Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde SVS – MS n° 152, de 26/02/1999, que aprova o Regulamento Técnico para produtos destinados à desinfecção de água para o consumo, e de produtos algicidas e fungicidas para piscinas, autoriza o uso de hipoclorito de sódio para desinfecção de água para o consumo humano. A Resolução RDC n° 77 de 2001, estende este regulamento a produtos para desinfecção de hortifrutícolas.

Segundo OLIVEIRA e SANTOS (2015) a sanitização, associada à lavagem eficiente é o único tratamento eficaz na redução de microrganismos em hortaliças minimamente processadas e, para esta etapa, recomenda a imersão das alfaces em água clorada (100 ppm) por 15 minutos. EMBRAPA (2004) recomenda o uso de hipoclorito de sódio com concentração de 100 a 200 ppm, por, pelo menos, 15 minutos. OLIVEIRA e SANTOS (2015) ainda recomendam posterior enxague em água clorada (20 ppm).

Segundo LEGNANI e LEONI, (2004), a concentração de cloro residual, além das temperaturas de estocagem, é um dos pontos críticos a serem controlados no processamento mínimo de vegetais.



Figura 6. Imagem representativa do processo de sanitização

Fonte: EMBRAPA, 2011

A etapa de centrifugação (Figura 7), tem como objetivo retirar a água da superfície das folhas, oriunda da sanitização e enxague (EMBRAPA, 2004) e os resíduos de exsudatos remanescentes do corte que favorecem o crescimento microbiano (EMBRAPA, 2004; OLIVEIRA e SANTOS, 2015). Segundo Oliveira e Santos, 2015, uma centrifugação ineficiente, ao não remover toda a água da superfície, acelera a deterioração, ao passo que, quando em excesso pode também resultar em redução da vida útil devido a desidratação, causando ressecamento e perda da coloração natural do produto. Assim deve-se atentar para a melhor combinação de tempo e velocidade de centrifugação, que deve variar entre 3 e 10 minutos, ajustando-se a velocidade que não cause dano ao produto.



Figura 7. Abastecimento manual da centrífuga com alfaces para etapa de centrifugação

Fonte: EMBRAPA, 2011

A embalagem é determinante para a vida de prateleira, devendo oferecer condições adequadas para a conservação do produto durante o armazenamento, a distribuição, a

comercialização e o consumo. Ela deve servir como uma barreira aos danos físicos e contaminação por microrganismos, insetos e roedores e controlar a entrada de gases e vapor de água do ambiente (OLIVEIRA e SANTOS, 2015). A integridade da embalagem deve ser assegurada e nela devem constar as datas de fabricação e de validade, o peso líquido, o fornecedor e o modo de conservação (EMBRAPA, 2004). A injeção de ar atmosférico no interior da embalagem, criando uma “almofada de ar” é capaz de reduzir danos mecânicos aos produtos, em virtude do amassamento de embalagens (Figura 8) (EMBRAPA, 2011).

Um processo tecnológico exitoso para conservação de vegetais minimamente processados é a embalagem em atmosfera modificada. Este processo consiste na substituição da atmosfera normal (78 % de N₂, 21 % de O₂ e 0,03 % de CO₂) por uma mistura de gases de composição conhecida e otimizada, incluindo a utilização de filmes poliméricos com seletiva permeabilidade ao O₂, CO₂, etileno (C₂H₄), N₂ e vapor de água (ARTÉS *et al.*, 2006).

A modificação gerada no interior da embalagem resulta dos processos de respiração do produto, difusão dos gases através da embalagem e permeabilidade do filme, determinando uma atmosfera final com elevado teor de CO₂ e baixo teor de O₂, reduzindo assim a respiração aeróbica, inibindo ou retardando o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes e limitando a ocorrência de reações oxidativas, como o escurecimento enzimático. A atmosfera modificada pode ser conseguida de forma passiva, como consequência da respiração e da permeabilidade seletiva dos filmes ou de forma ativa pela adição ou remoção de uma mistura de gases (KLUGE *et al.*, 2016).

Podem ser utilizadas embalagens flexíveis ou rígidas, com tampas ou recobertas com filme plástico esticável, como por exemplo, o policloreto de vinila (PVC) (SARANTÓPOULOS, 2002 *apud* EMBRAPA, 2011).

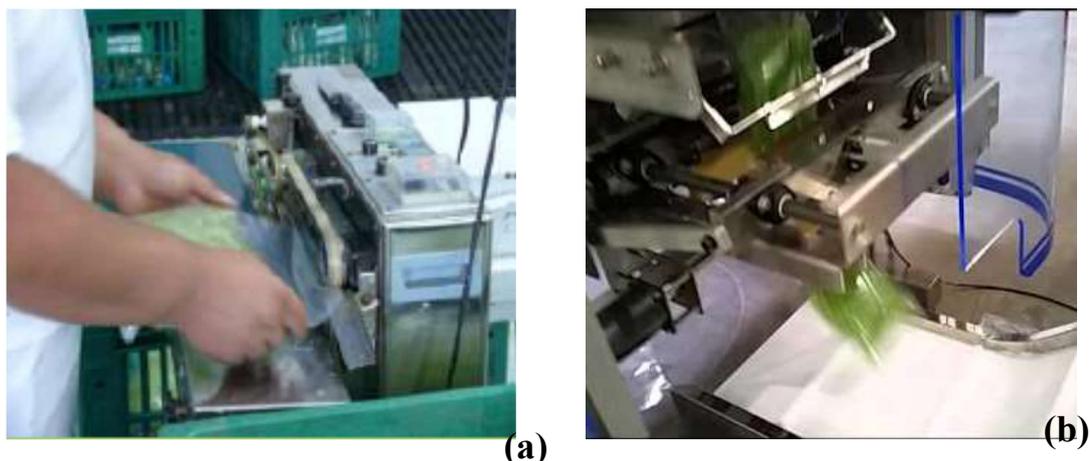


Figura 8. Acondicionamentos (a) manual e (b) automatizado.

Fonte: EMBRAPA, 2011

Após o embalamento em embalagens primárias, ocorre o embalamento secundário, quando os produtos são colocados em caixas higienizadas para armazenamento e posterior distribuição. Estas embalagens secundárias, também denominadas embalagens de expedição objetivam facilitar o manuseio mecânico eficiente (EMBRAPA, 2011).

Durante o armazenamento, a temperatura em que este ocorre é relevante para o retardamento da perda de umidade, e das características nutricionais, redução da multiplicação microbiana e manutenção da qualidade sensorial (OLIVEIRA e SANTOS, 2015). O Manual de Segurança e Qualidade na Produção de Alface Minimamente Processada da EMBRAPA, recomenda o armazenamento em câmara fria (Figura 9) a 5 °C (EMBRAPA, 2004). Para OLIVEIRA e SANTOS (2015), temperaturas de 5 a 10 °C são utilizadas na prática em função de razões econômicas, porém a temperatura ideal para o armazenamento de folhosas é próxima de 0°C.



Figura 9. Armazenamento refrigerado

Fonte: EMBRAPA, 2011

A cadeia de frio deve ser mantida durante o processo de distribuição, portanto o transporte deve ser realizado em veículo refrigerado (Figura 10), a uma temperatura em torno de 5 °C, segundo OLIVEIRA e SANTOS (2015), ou segundo EMBRAPA (2004) entre 2 e 4°C.



Figura 10. Caminhão refrigerado utilizado para o transporte de hortaliças minimamente processadas.

Fonte: EMBRAPA, 2011

O uso de baixas temperaturas, entre 0 e 5 °C, também deve ser mantido durante a comercialização. Assim, é necessário que as alfaces minimamente processadas sejam comercializadas dentro de gôndolas refrigeradas (Figura 11) (KLUGE *et al.*, 2016).



Figura 11. Comercialização de hortaliças minimamente processadas em gôndolas refrigeradas.

Fonte: EMBRAPA, 2011

2.3 CONTAMINAÇÃO DE ALFACES MINIMAMENTE PROCESSADAS

Desde a fazenda até a mesa do consumidor, são inúmeros os fatores capazes de comprometer a integridade microbiológica dos vegetais. Os riscos durante a pré-colheita, no entanto, têm sido reconhecidos como um dos mais importantes, pois, se a contaminação por patógenos for estabelecida no campo, a descontaminação se torna um desafio (ALEGBELEYE, SINGLETON e SANT'ANA, 2018).

A contaminação de vegetais é favorecida pela proximidade com o solo, a água de irrigação contaminada e os trabalhadores agrícolas (KARUMATHIL *et al.*, 2016) e tem seu risco aumentado pelas operações de corte, lavagem e embalagem, quando estas são realizadas manualmente (OLIVEIRA e SANTOS, 2015).

A família bacteriana encontrada com maior frequência nos vegetais é a *Enterobacteriaceae* (FALOMIR, RICO & GOZALBO, 2013; LEFF & FIERER, 2013), que é composta por bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, podendo ser móveis ou imóveis e capsulados ou não (OSAILI, 2018).

Em todo o mundo, doenças transmitidas por alimentos são uma causa significativa de morbidade e mortalidade, e, embora, crianças, idosos, gestantes e imunocomprometidos, constituam um grupo de maior risco de contraí-las, não se restringem a estes (ALEGBELEYE, SINGLETON e SANT'ANA, 2018).

Segundo Alegbeleye, Singleton e Sant'Ana (2018), muitos surtos de origem alimentar têm sido associados a vegetais e o grupo microbiano mais comumente envolvido em doenças transmitidas por alimentos frescos são as bactérias. Dentre estas, os principais agentes etiológicos, são *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*. Esses dados são semelhantes aos relatados pelo Ministério da Saúde do Brasil sobre surtos alimentares de uma forma geral (BRASIL, 2018).

Diversos relatos também correlacionam produtos minimamente processados como importantes veículos de transmissão de patógenos (BEUCHAT, 2002; BERGER *et al.*, 2010; NEWELL *et al.*, 2010), sobretudo pelo fato dos mesmos já se apresentarem prontos para o consumo, não sofrendo nenhum outro processo antes da ingestão pelo consumidor (CARVALHEIRA *et al.*, 2017). A contaminação deste produto e o envolvimento deles em surtos alimentares é um desafio para a segurança de alimentos (HUSSAIN & GOONERATNE, 2017).

A alface se destaca como a hortaliça folhosa mais popular no Brasil (SALA e COSTA, 2012) e é frequentemente associada a doenças transmitidas por alimentos, sendo fonte comum de contaminação bacteriana (BERGER *et al.*, 2010).

No Brasil, a legislação vigente, RDC N° 12, de 02 de Janeiro 2001, estabelece como padrão microbiológico sanitário para hortaliças frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, o limite de 10² Unidades formadoras de colônia (UFC) de Coliformes a 45°C por grama de produto e ausência de *Salmonella* em 25g de produto (Tabela 1). Não há, entretanto, parâmetro estabelecido para contagem total de aeróbios mesófilos.

Tabela 1. Padrão microbiológico sanitário para alfaces minimamente processadas.

HORTALIÇAS, legumes e similares, incluindo COGUMELOS (fungos comestíveis)						
b) frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, com exceção de cogumelos	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	10	10 ²
	<i>Salmonella</i> sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

Fonte: RDC 12/2001

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida, envolvendo mutações em genes alvo do antibiótico ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias (ALEKSHUN e LEVY, 2007).

O papel do meio ambiente na origem e transmissão da resistência requer mais investigação (BALSALOBRE *et al.*, 2010).

Pesquisas em todo o mundo estão expandindo seus estudos para além dos hospitais em busca da presença de genes resistentes em isolados bacterianos a partir de fontes não clínicas, como alimentos, água, solo, esgoto e outros (BALSALOBRE *et al.*, 2010; 2014), associando

esses dados à presença de antibióticos no meio ambiente, seu uso na terapia veterinária e na agricultura (BALSALOBRE *et al.*, 2014).

KARUMATHIL e colaboradores (2016) ressaltam a importância do monitoramento, além da diversidade microbiana, também do perfil de resistência a antimicrobianos em produtos frescos, para que avaliações de risco e intervenções adequadas possam ser instauradas.

Os vegetais frescos podem atuar como reservatórios e transportadores de bactérias resistentes aos antimicrobianos, disseminando esta resistência pela cadeia alimentar, carreando-a da fazenda para os consumidores (FALOMIR, RICO e GOZALBO, 2013; CARVALHEIRA *et al.*, 2017).

A presença de microrganismos patogênicos e resistentes a antimicrobianos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em produtos frescos constitui uma ameaça severa ao consumidor (OSAILI *et al.* 2018). Isto porque, a escolha do antibiótico se torna limitada, há a possibilidade de falha no tratamento, os microrganismos resistentes adquirem vantagem em uma futura antibioticoterapia por outras razões médicas, bem como a resistência antimicrobiana pode vir acompanhada de um possível maior risco do aumento da virulência (GOODERHAM e HANCOCK, 2009 *apud* VERRAES, 2013)

2.5 HIPOCLORITO DE SÓDIO COMO SANITIZANTE DE ALFACES MINIMAMENTE PROCESSADAS

No processamento mínimo, as barreiras de eliminação de microrganismos são as tecnologias de barreiras ou obstáculos, as quais incluem lavagem, sanitização, embalagem em atmosfera modificada e refrigeração (OLIVEIRA e SANTOS, 2015).

O hipoclorito de sódio é o agente mais utilizado na sanitização (MACHADO *et al.*, 2010). Seu mecanismo de ação consiste em aumentar o pH do meio, o que resulta em modificações na estrutura da célula com consequentes danos à membrana externa, degeneração ou inibição irreversível das proteínas do citoplasma, além de reações de oxidação, podendo haver também, reações de cloraminação e saponificação (Estrela, 2000).

Apesar de sua ampla utilização, estudos têm relatado inúmeros isolados bacterianos evidenciando resistência ao cloro. A resistência ao cloro, sobretudo de patógenos, pode contribuir para a redução da vida útil de produtos minimamente processados e envolvimento destes alimentos em surtos de origem alimentar (MACHADO *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado ainda que o estresse ou exposição bacteriana a condições subletais podem induzir a resistência antimicrobiana. Fato relevante, visto que a sanitização de alfaces minimamente processadas utilizando hipoclorito de sódio, embora, tenha como objetivo a redução da carga microbiana, pode resultar em microrganismos sobreviventes, estressados ou danificados subletalmente. (VERRAES *et al.*, 2013).

Nos diversos estudos que têm sido realizados para avaliação da eficácia do hipoclorito de sódio sobre cepas bacterianas inoculadas em vegetais, segundo Silva e colaboradores 2003, há uma grande variação nas condições dos ensaios realizados, pois estes não relatam minuciosamente a metodologia utilizada e não padronizam importantes variáveis como a concentração do desinfetante, tempo de contato, temperatura, forma de preparação do inóculo, superfície inoculada e a forma como a população microbiana sobrevivente foi quantificada. Sendo assim, faz-se necessário a padronização de métodos de determinação de eficácia de sanitizantes contra patógenos em frutas e vegetais (BEUCHAT, 2001)

Segundo Silva e colaboradores (2003) o método de suspensão, quando os microrganismos são suspensos diretamente na solução desinfetante, além de ser mais barato, mais simples e menos trabalhoso, quando comparado à inoculação direta dos microrganismos em vegetais, apresenta como vantagem permitir a comparação dos resultados obtidos em qualquer laboratório, entretanto apresenta a limitação de não reproduzir as condições de adesão e biofilme observados na desinfecção de vegetais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, quanto ao perfil de sensibilidade a antibióticos e a hipoclorito de sódio, bactérias isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas no município de Niterói, Rio de Janeiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar microrganismos aeróbios mesófilos em alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ;
- b) Isolar coliformes e *Salmonella* presentes nas amostras;
- c) Caracterizar os isolados obtidos quanto à sensibilidade a antibióticos;
- d) Caracterizar os isolados obtidos quanto à sensibilidade ao hipoclorito de sódio;
- e) Correlacionar os perfis de resistência a antibióticos e a hipoclorito de sódio

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

Foram coletadas, no período de Maio a Dezembro de 2018, 13 amostras de alfaces minimamente processadas, de diferentes variedades, em três diferentes mercados locais na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, sendo um hortifruti, onde as alfaces eram processadas no próprio local de venda e dois supermercados, onde as amostras eram oriundas de processamento industrial (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição das amostras de alface minimamente processadas

Identificação	Amostra	Local de coleta	Forma de processamento
A	Alface americana		
B	Alface crespa	Hortifruti	Local
C	Alface americana		
D	Alface roxa		
E	Alface crespa		
F	Alface lisa	Supermercado 1	
G	Alface lisa		
H	Alface americana		Industrial
I	Alface roxa		
J	Alface crespa orgânica		
K	Alface americana orgânica	Supermercado 2	
L	Alface americana orgânica		
M	Alface lisa orgânica		

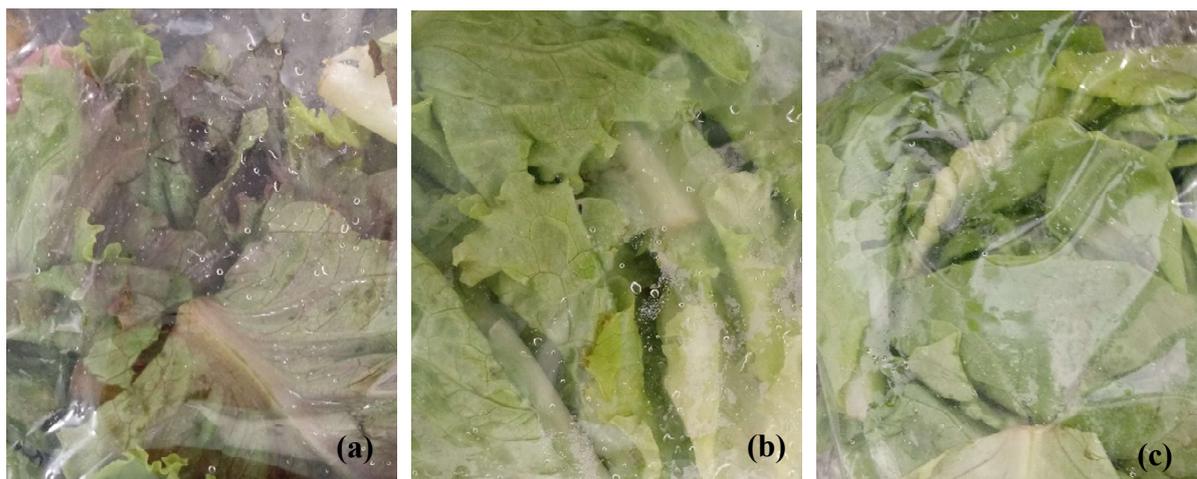


Figura 12. Amostras (a) alface roxa (b) alface crespa e (c) alface lisa

Fonte: Autora

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram transportadas sob refrigeração em bolsa térmica contendo gelo reciclado até o Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, e submetidas às análises microbiológicas em até 2 h após aquisição das mesmas.

No laboratório, a embalagem de cada produto foi higienizada com álcool a 70% (v/v) e as amostras foram identificadas sequencialmente por letras. As embalagens foram abertas com auxílio de tesoura estéril. As folhas de alface foram picadas e retiradas da embalagem com auxílio de pinça estéril. Em seguida, 25 g do alimento foram transferidos, sob condições assépticas, para frasco reagente contendo 225 mL de Água Peptonada Tamponada estéril a 1% (p/v) com posterior homogeneização manual e diluições seriadas (até 10^{-4}).

As diluições, assim obtidas, foram usadas nos métodos descritos nos itens 4.3 a 4.5 deste trabalho.



Figura 13. Embalagem de alface crespa aberta para pesagem

Fonte: Autora

4.3 CONTAGEM DE AERÓBIOS MESÓFILOS

A contagem de aeróbios mesófilos foi realizada pela inoculação em duplicata de 0,1 mL de cada diluição em placas estéreis contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA), seguido do espalhamento do inóculo com auxílio de alça de Drigalski, e posterior incubação a 37°C por 48h.

4.4 PESQUISA DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

A pesquisa de Coliformes Termotolerantes foi realizada conforme preconizado pela Instrução Normativa nº 62. Para tanto foi realizada a inoculação em duplicata de 0,1 mL de cada diluição em Ágar Vermelho Violeta Bile com Lactose (VRBL), seguido do espalhamento do inóculo na superfície do meio com auxílio de alça de Drigalski e incubação a 37 °C por 48h.

As colônias típicas e atípicas isoladas receberam identificação numérica sequencial, sendo posteriormente repicadas em Ágar Nutriente, com incubação a 37 °C por 24h. Após

isolamento, as bactérias foram preservadas por congelamento, entre -4 e -20°C, em caldo triptona de soja (TSB) contendo 20% (v/v) de glicerol.

A confirmação de Coliformes Termotolerantes foi feita pela inoculação das colônias suspeitas em Caldo *E. coli* (EC) e incubação em banho-maria a 45 °C por 24 a 48 h. A presença de Coliformes Termotolerantes é confirmada pela formação de gás nos tubos de Durhan, originado da fermentação da lactose presente no meio.

4.5 PESQUISA DE *Salmonella*

Inicialmente foi realizada a etapa de pré-enriquecimento, quando as diluições 10^{-1} foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 h. Após incubação, o enriquecimento seletivo foi realizado transferindo-se 0,1 mL do caldo de pré-enriquecimento para tubo contendo 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis, 1 mL para tubo contendo 10 mL de Caldo Selenito-Cistina e 1 mL para tubo contendo 10 mL de Caldo Tetracionato com posterior incubação a 41 °C em banho-maria por 24 a 30 h. O plaqueamento diferencial foi realizado a partir de cada tubo de enriquecimento seletivo, quando foi estriada uma alçada em Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS), repetindo o mesmo procedimento para Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar *Salmonella*-Shigella (SS) com posterior incubação a 37 °C por 18 a 24 h.

4.6 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS

As colônias típicas e atípicas obtidas nos vários meios de cultura utilizados foram repicadas em Ágar Nutriente, com posterior incubação a 37 °C por 24 h e posteriormente preservados pela transferência para Eppendorf contendo aproximadamente 2 mL de Caldo TSB com 20% de glicerol (v/v) e, em seguida, armazenados em freezer, entre -4 e -20 °C.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS

Os isolados foram reativados em TSA, com incubação a 37 °C por 24 h e a identificação realizada por espectrometria de massa, baseada na Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser - MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*), utilizando o equipamento MALDI Biotyper (Bruker®) do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) (Figura 14), do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).



Figura 14. Procedimento simplificado da identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF

Fonte: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2016

Os isolados bacterianos receberam *score* de identificação conforme valores de pontuação apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Interpretação dos valores de pontuação obtidos por MALDI-TOF

Alcance	Descrição	Símbolo	Cor
2.300 - 3.000	Identificação altamente provável das espécies	(+++)	Verde
2.000 - 2.299	Identificação segura do gênero, identificação provável das espécies	(++)	Verde
1.700 - 1.999	Identificação provável de gênero	(+)	Amarelo
0.000 - 1.699	Identificação não confiável	(-)	Vermelho

Fonte: Bruker, 2019

4.8 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Os isolados bacterianos, identificados a nível de espécie, isto é, que receberam *score* de identificação acima de 2.000, foram selecionados para caracterização do perfil de resistência frente aos antibióticos descritos na tabela 4, pelo método de difusão em disco, também conhecido como Kirby-Bauer, descrito em *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018)*. Após reativação dos isolados em TSA e incubação a 37 °C por 24 h, as cepas foram transferidas para tubos contendo solução de Cloreto de sódio (NaCl) 0,85% (p/v) até obtenção de turvação compatível com a escala 0,5 Mc Farland. Em seguida, com auxílio de *swab* estéril, cada isolado foi semeado por toda a superfície do meio Ágar Mueller Hinton, sendo posteriormente posicionados na superfície do meio os discos impregnados com os antibióticos. As placas contendo os discos de antibióticos foram incubadas a 37 °C por 24 h, procedendo-se a leitura dos halos de inibição e classificação dos isolados como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R), conforme interpretação do manual CLSI (2018). Os isolados que apresentaram resistência a, pelo menos, três antibióticos de classes diferentes, foram classificados como multirresistentes.

Tabela 4. Antibióticos empregados no estudo

Classe	Antibiótico	Código
Penicilinas	Ampicilina	AMP 10
Combinação de agentes β -lactâmicos	Ampicilina + Subactam	APS 20
	Amoxicilina + Ác. Clavulânico	AMC 30
	Piperaciclina + Tazobactam	PIT 110
Tetraciclinas	Tetraciclina	TET 30
Monobactâmicos	Aztreonam	ATM 30
Cefalosporinas – 2 ^a geração	Cefoxitina	CFO 30
	Cefuroxima	CRX 30
Cefalosporinas – 3 ^a geração	Cefotaxima	CTX 30
	Ceftazidima	CAZ 30
Cefalosporinas – 4 ^a geração	Cefepime	CPM 30
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP 05
Anfenicóis	Cloranfenicol	CLO 30
Carbapenêmicos	Ertapenem	ERT 10
	Imipenem	IPM 10
Aminoglicosídeos	Gentamicina	GEN 10
	Tobramicina	TOB 10
Sulfonamidas	Sulfametoxazol-Trimetoprima	SUT 25

4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO

4.9.1 Determinação do teor de cloro ativo na água sanitária comercial utilizada para preparo da solução de hipoclorito de sódio

Foi utilizada água sanitária comercial, adquirida em supermercado local, cujo rótulo recomendava, entre outras aplicações, a desinfecção de frutas, verduras e congêneres.

O teor de cloro ativo (Cl_2) foi verificado em triplicata, pelo método iodométrico

(VOGEL *et al*; 2008), no Laboratório de Química Analítica do IFRJ.

4.9.1.1 Preparo da amostra

Foram transferidos, com uso de pipeta volumétrica, 25 mL da amostra de água sanitária para um balão volumétrico de 250 mL sendo o volume ajustado para 250 mL com a adição de água deionizada.

4.9.1.2 Titulação

Foram transferidos, com o auxílio de pipeta volumétrica 20 mL da solução de água sanitária para um frasco de índice de iodo de 500 mL e acrescentado 100 mL de água deionizada. Foram adicionados 1,5 g de KI sólido e 10 mL de H₂SO₄ 1 N e o frasco foi tampado imediatamente. Em torno da borda foi adicionado solução selo de iodo e em seguida o frasco foi deixado em repouso por três minutos em local escuro.

O frasco foi então destampado e, após a solução selo cair em seu interior, carregando vapores de iodo, foi feita a titulação até obtenção da coloração amarela.

Após acrescentar 70 mL de água deionizada e 2 mL de goma de amido, a titulação foi completada até o ponto de viragem, evidenciado pelo desaparecimento da cor azul, conforme apresentado na Figura 15.

Após obtenção dos resultados da titulação iodométrica, foi calculado o teor de cloro ativo da água sanitária.

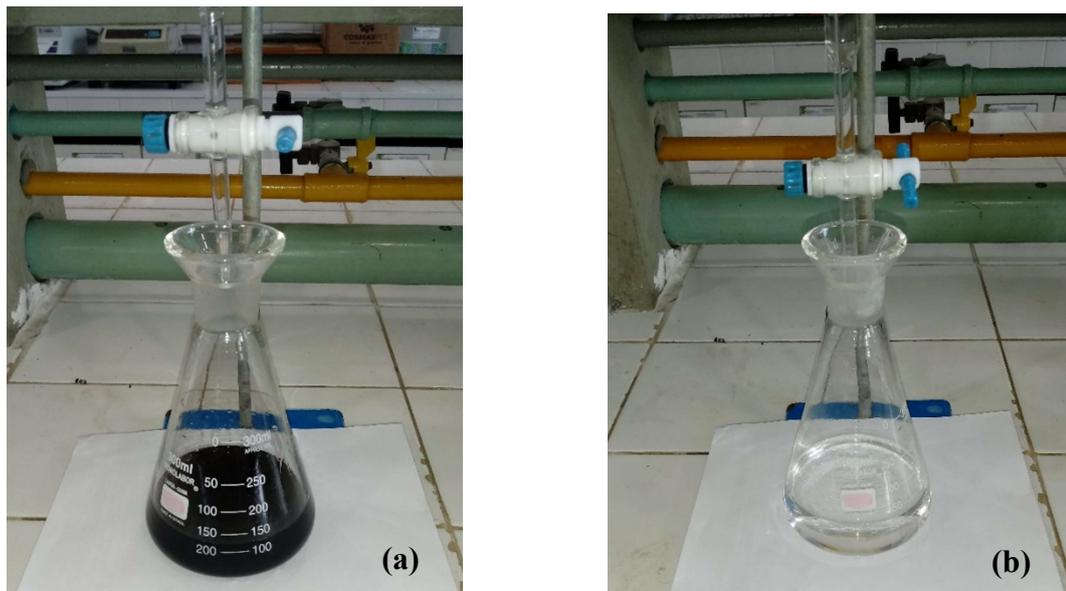


Figura 15. Coloração da (a) azul escura do complexo amido-I3 desaparece, gerando uma (b) solução incolor.

Fonte: Autora

4.9.2 Preparo da solução estoque de hipoclorito de sódio

Considerando a concentração de cloro ativo obtida a partir da titulação realizada, uma solução estoque de 250 mL de hipoclorito de sódio a 400 ppm foi preparada, diluindo-se 4 mL da água sanitária comercial em 250 mL de água destilada estéril.

4.9.3 Teste de suspensão bacteriana

Os isolados bacterianos, identificados a nível de espécie, isto é, que receberam *score* de identificação acima de 2.000, foram selecionados para caracterização do perfil de resistência frente ao hipoclorito de sódio nas concentrações 200 ppm, 100 ppm e 50 ppm, pelos tempos de contato de 10, 15 e 20 minutos, conforme método sugerido pela Portaria nº 101 de 1993, com adaptações para microtitulação em caldo.

Após a reativação dos isolados em Agar tripton de soja (TSA) e incubação a 37 °C por 24 h, as cepas foram transferidas para tubos contendo solução NaCl 0,85% (p/v) até obtenção de turvação compatível com a escala 0,5 Mc Farland, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL. Em seguida esta solução foi diluída 1:100 para se obter uma concentração de 10^6 UFC/mL, a fim de que, quando 10 μ L do inóculo fossem adicionados à solução de hipoclorito

de sódio, a concentração final de bactérias do teste fosse, aproximadamente, 10^5 UFC/mL (ou 10^4 UFC/poço considerando o volume final de reação de 100 μ L).

Todos os poços das microplacas receberam 100 μ L de água destilada estéril. Foram feitas diluições sucessivas adicionando 100 μ L de solução de hipoclorito de sódio 400 ppm e transferindo, após homogeneização, 100 μ L da coluna anterior para coluna seguinte, obtendo-se as concentrações 200ppm, 100ppm e 50 ppm.

Posteriormente foram adicionados 10 μ L do inóculo e, após os tempos de contato de 10, 15 e 20 min, 10 μ L foram transferidos para poços de uma segunda microplaca contendo 100 μ L de TSB com 1% de tiosulfato de sódio, para inativação do hipoclorito de sódio, evitando, assim, interferência de cloro residual.

As microplacas foram incubadas a 37°C, procedendo-se a leitura, após 96 h observando-se o crescimento microbiano, evidenciado pela turvação.

Para controle positivo foi utilizado TSB com tiosulfato de sódio 1% (p/v) acrescido do inóculo, para controle negativo TSB com tiosulfato de sódio 1% (p/v) e hipoclorito e para o teste de esterilidade do meio, foi adicionado ao respectivo poço somente o meio de cultura TSB com 1% (p/v) de tiosulfato de sódio.

As figuras 16 e 17 apresentam os esquemas do teste de suspensão adaptado para microtitulação.

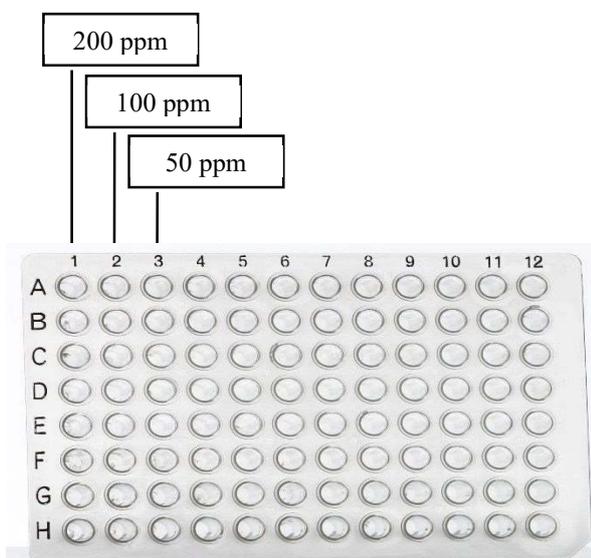


Figura 16. Esquema das microplacas utilizadas para contato dos isolados com o hipoclorito de sódio nas concentrações 200 ppm, 100 ppm e 50 ppm.

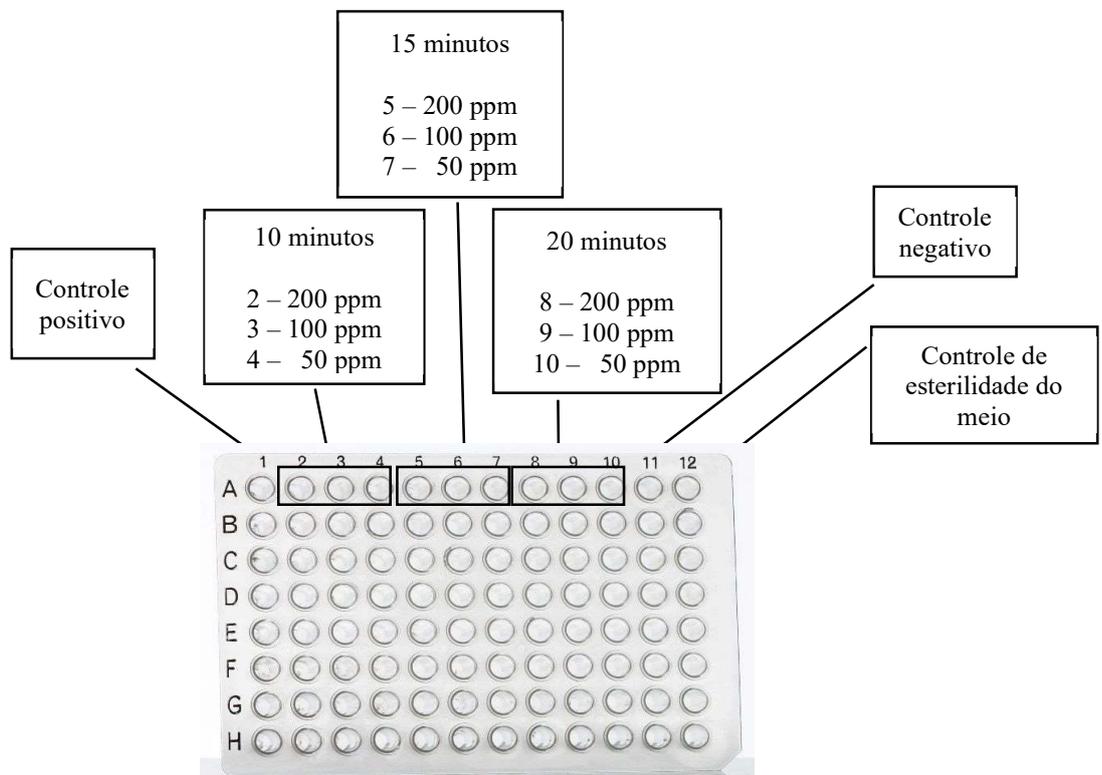


Figura 17. Esquema das microplacas utilizadas para incubação após os tempos de contato com as variadas concentrações

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AERÓBIOS MESÓFILOS

As alfaces minimamente processadas analisadas neste estudo apresentaram contagens de aeróbios mesófilos entre 4,60 e 7,48 log UFC/g (Tabela 5), revelando uma menor amplitude de valores que Szabo e colaboradores (2000) que obtiveram contagens de aeróbios mesófilos entre 3 e 9 log UFC.g⁻¹.

Tabela 5. População de aeróbios mesófilos presentes em alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ

Identificação	Amostra	Mesófilos Log (UFC.g⁻¹)
A	Alface americana	5,84
B	Alface crespa	6,36
C	Alface americana	7,48
D	Alface roxa	6,20
E	Alface crespa	5,83
F	Alface lisa	6,00
G	Alface lisa	6,03
H	Alface americana	4,60
I	Alface roxa	6,96
J	Alface crespa orgânica	7,37
K	Alface americana orgânica	5,44
L	Alface americana orgânica	5,86
M	Alface lisa orgânica	5,31

Embora o Brasil não estabeleça padrão para contagem total de aeróbios mesófilos, alguns países o fazem. França e Alemanha especificam limite de $7,7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em vegetais prontos para o consumo (LEGNANI e LEONI, 2004). Japão especifica, que para vegetais frescos, a contagem padrão de mesófilos considerada segura é inferior a $5 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (MAISTRO, 2006 *apud* SANTOS, 2010). Considerando os padrões de França e Alemanha, todas as amostras estariam satisfatórias. Já, considerando o padrão mais rígido do Japão, 12 amostras estariam insatisfatórias, o que corresponde a, aproximadamente, 92%.

Segundo Brackett e Splitstoesser (2001) *apud* SANTOS, 2010, os microrganismos aeróbios mesófilos compõem a microbiota normal de vegetais frescos e tenham pouca relação com qualidade ou segurança da matéria-prima, este parâmetro nos oferece importante informação quanto à vida útil dos minimamente processados. Isto porque, segundo SANTOS, 2010, estes microrganismos participam ativamente da deterioração destes alimentos e sobretudo pelo fato de serem mais percíveis do que as matérias primas, devido às injúrias oriundas do processo e ao maior teor de umidade nas embalagens fechadas.

Considerando como limite 10^6UFC/g , contagem em que, quando excedida, a maioria dos alimentos apresentam alterações organolépticas detectáveis, 7 amostras (53,85%) estariam reprovadas, embora, visualmente se apresentassem adequadas ao consumo.

Microrganismos mesófilos indicam também abuso do binômio tempo/temperatura, o que favorece a deterioração dos produtos e a multiplicação de patógenos.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os gêneros predominantemente isolados foram *Enterobacter* (21%) e *Pseudomonas* (18%) (Gráfico 1). Este dado é corroborado pelos resultados apresentados por Marchetti *et al.*, 1992 *apud* MAISTRO, 2005, que relatam que em vegetais minimamente processados predominam estes gêneros.

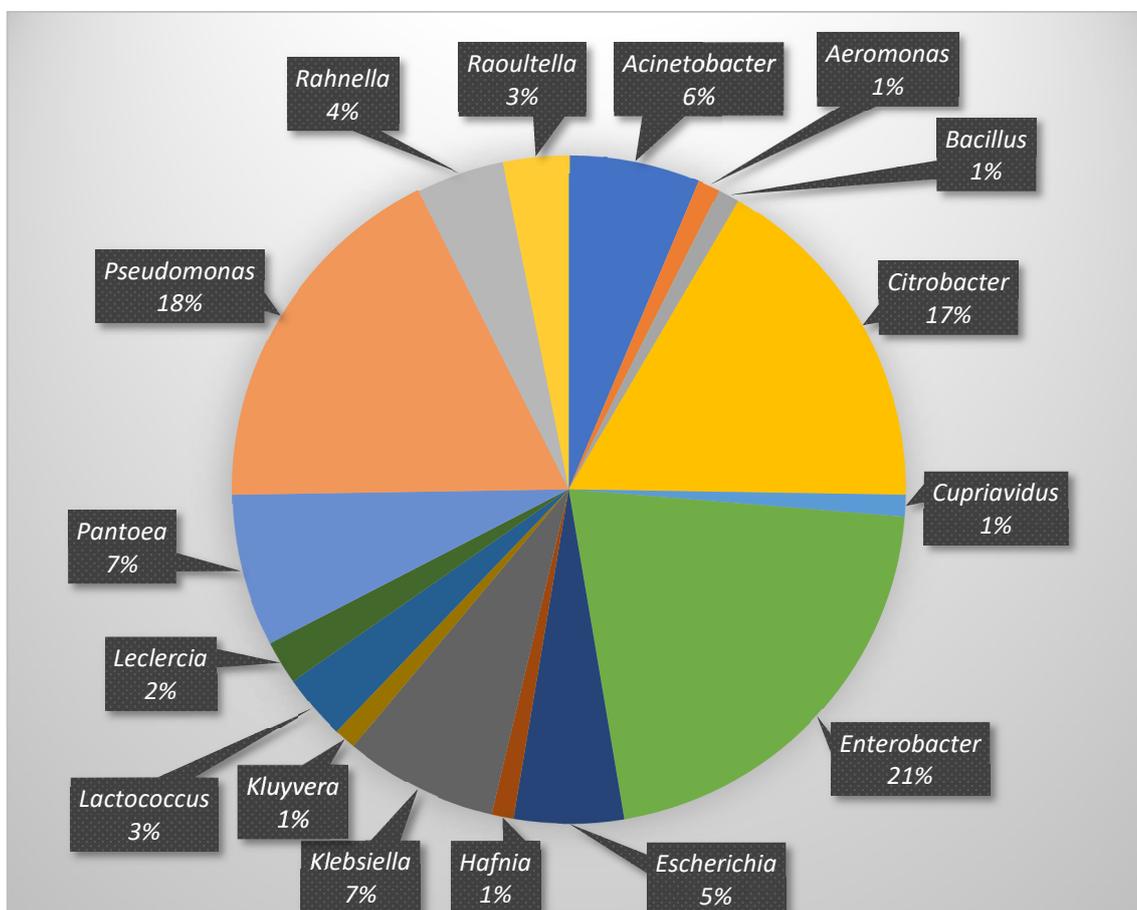


Gráfico 1. Prevalência de gêneros bacterianos isolados de alfaces MP comercializadas em Niterói/RJ

As espécies predominantemente isoladas foram *Enterobacter cloacae* (18%) e *Citrobacter freundii* (18%) (Gráfico 2). Osaili *et al.*, 2018, isolou de amostras de alface iceberg frescas, predominantemente, *Klebsiella pneumoniae*, seguido por *Enterobacter cloacae*.

E. cloacae, embora amplamente encontrado na natureza, também é considerado patógeno e figura entre os mais frequentes causadores de infecções nosocomiais (DAVIN-REGLI e PAGÈS, 2015)

Citrobacter freundii, anteriormente conhecido como contaminante ambiental ou de baixa virulência, hoje é conhecido por causar infecções envolvendo trato urinário, fígado, peritônio, intestinos, ossos, trato respiratório, endocárdio, meninge e corrente sanguínea.

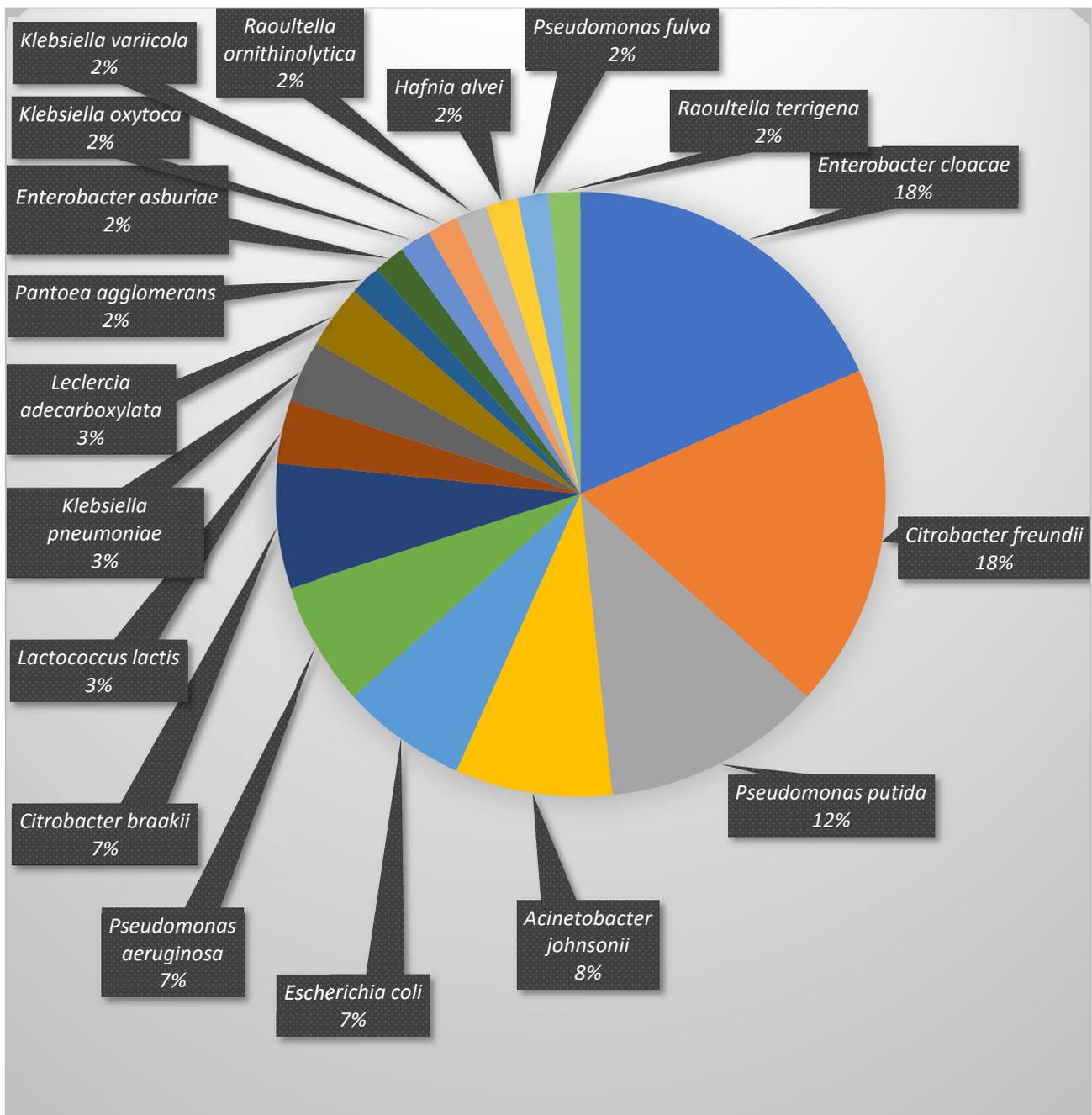


Gráfico 2. Espécies bacterianas isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ

Escherichia coli foi detectada em duas amostras (15%) (Tabela 6), valor numericamente coincidente, porém percentualmente superior, ao encontrado por Brandão e colaboradores, 2014 que também detectaram *E. coli* em duas amostras, porém estas correspondiam a apenas

6,7% das amostras analisadas de alfaces MP comercializadas no Rio de Janeiro. A presença de *E. coli* em vegetais frescos é indicador de contaminação fecal (Loncarevic et al., 2005) e de sanitização deficiente (Brandão et al., 2014).

Leclercia adecarboxylata foi detectada em duas amostras (15%) (Tabela 6). *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* e *Pantoea agglomerans*, *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella terrigena* foram detectadas em uma amostra (8%) (Tabela 6). Espécies semelhantes foram isoladas por Osaili e colaboradores, 2018 em alfaces comercializadas na Jordânia.

Não houve detecção de *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas (Tabela 6), indicando baixa incidência deste patógeno nas alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ e conformidade das amostras à RDC 12/2001, que estabelece como parâmetro ausência de *Salmonella* em 25 gramas de amostra analisada.

Este resultado coincide com o estudo realizado por Brandão e colaboradores, 2014, que também não encontraram *Salmonella* em amostras de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro/RJ.

Santos e colaboradores, 2010 ao analisarem frutas e hortaliças minimamente processadas comercializadas na região de Campinas/SP, entre as quais se encontravam alfaces, também verificaram ausência de *Salmonella*.

Segundo Barbosa e colaboradores (2016), outros estudos realizados afirmam que a contaminação de *Salmonella* spp em hortaliças e frutas é mais rara, não sendo comum ultrapassar os 20% das amostras analisadas.

Houve detecção de *Lactococcus lactis* em uma amostra (8%) (Tabela 6). Bactérias ácido lácticas foram detectadas em saladas folhosas mistas quando a temperatura de armazenamento não foi mantida de forma correta (30°C) (Francis et al., 1999 *apud* MAISTRO, 2005).

Pseudomonas putida foi isolada em quatro amostras (31%), sendo esta a espécie de *Pseudomonas* mais distribuída entre as alfaces MP analisadas (Tabela 6).

Esta espécie é encontrada frequentemente em nichos ambientais e, embora, raramente cause doenças em seres humanos, há relatos de infecções e graves surtos relacionados a ela. Há sobre esta espécie, ainda, a sugestão de que funcione como uma plataforma de troca de genes de resistência a antibióticos, exercendo papel importante na disseminação desses genes para organismos mais patogênicos dentro de um hospital (PETER et al., 2017).

A troca de genes de resistência a antibióticos entre *P. putida* e a *Pseudomonas*

aeruginosa mais virulenta, embora pouco compreendida, é relevante no que tange ao planejamento de estratégias eficientes de controle de infecção hospitalar, como, por exemplo, a decisão de isolar ou não pacientes de alto risco colonizados por esta espécie, quando, esta, embora tipicamente de baixa patogenicidade, revelar-se multirresistente (PETER *et al.*, 2017)

Tabela 6. Distribuição das espécies bacterianas isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ

Isolados	Amostras positivas	
	n	%
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	54
<i>Citrobacter freundii</i>	6	46
<i>Citrobacter braakii</i>	4	31
<i>Pseudomonas putida</i>	4	31
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	3	23
<i>Escherichia coli</i>	2	15
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2	15
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	8
<i>Hafnia alvei</i>	1	8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	8
<i>Klebsiella variicola</i>	1	8
<i>Lactococcus lactis</i>	1	8
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	8
<i>Pseudomonas fulva</i>	1	8
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	8
<i>Raoultella terrigena</i>	1	8

Pseudomonas aeruginosa foi isolada de uma amostra (8%). Esta espécie é considerada um patógeno oportunista, entretanto há relatos de infecções em hospedeiros saudáveis

(HATCHETTE, GUPTA e MARRIE, 2000 *apud* ALLYDICE-FRANCIS e BROWN, 2012). Há ainda evidências que sugerem não haver grande diferença, em relação à virulência, entre isolados clínicos e isolados ambientais (ALLYDICE-FRANCIS e BROWN, 2012). A contaminação de vegetais por *P. aeruginosa* pode ocorrer no campo, durante a colheita e processamento. O consumo de vegetais crus contaminados por este microrganismo pode resultar em implicações graves para a saúde humana (BEUCHAT, 1996 *apud* ALLYDICE-FRANCIS e BROWN, 2012)

Acinetobacter johnsonii foi isolado em três amostras (23%) (Tabela 6). Carvalheira e colaboradores (2017), também encontraram isolados de *Acinetobacter johnsonii* (26,5%) em alfaces prontas para o consumo comercializadas em Portugal.

5.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

5.3.1 Perfil de sensibilidade a antibióticos de *Enterobacteriaceae*

A multirresistência antimicrobiana foi evidenciada por 15 isolados (37,5%), estes pertenciam às espécies *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter braakii* (Tabela 7).

O teste de sensibilidade antimicrobiana de enterobactérias isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói revelou maior sensibilidade a Tetraciclina, Cefuroxima e Cloranfenicol (97,5%), seguida por Ertapenem e Sulfametoxazol-Trimetropim (95%) (Tabela 8).

A maior resistência foi apresentada frente a Ampicilina (53%), Cefoxitina (52,5%) e Amoxicilina/Ácido Clavulânico (47,5%). Nenhum dos isolados evidenciou resistência frente a Piperaciclina + Tazobactam, Tetraciclina, Cefuroxima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina e Trobramicina (Tabela 8). A cepa mais resistente foi *Enterobacter cloacae*, que apresentou resistência frente a cinco antibióticos, Ampicilina, Ampicilina + Sulbactam, Amoxicilina + Ác. Clavulânico, Cefoxitina, Cefotaxima (Tabela 15).

Nascimento e colaboradores, 2005 em estudo realizado em São Luis/MA, também verificaram resistência antimicrobiana em enterobactérias isoladas de alfaces, sendo a Cefotaxima o único antibiótico eficaz contra todos os isolados testados e *Klebsiella pneumoniae* a cepa mais resistente.

Tabela 7. Perfil de resistência e multirresistência antimicrobiana de enterobactérias isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ

RESISTÊNCIA	ISOLADOS	
	n	%
Resistência a 1 antibiótico	6	15
Resistência a 2 antibióticos	9	22,5
Resistência a 3 antibióticos	11	27,5
Resistência a 4 antibióticos	3	7,5
Resistência a 5 antibióticos	1	2,5
Multirresistência	15	37,5

Tabela 8. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Enterobacteriaceae* isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ

SENSIBILIDADE	ANTIBIÓTICOS																																			
	Penicilina		Combinação de β-lactâmicos				Tetraciclina		Monobactâmicos		Cefalosporina - 2 ^a geração		Cefalosporina - 3 ^a geração		Cefalosporina - 4 ^a geração	Quinolonas	Anfencóis	Carbapenêmicos		Aminoglicosídeos		Sulfonamidas														
	AMP		APS		AMC		PIT		TET		ATM		CFO		CRX		CTX	CAZ	CPM	CIP	CLO	ERT	IPM	GEN	TOB	SUT										
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%										
Sensível	16	40	34	85	17	42,5	34	85	39	97,5	37	92,5	18	45,0	39	97,5	30	75	35	87,5	35	87,5	36	90	39	97,5	38	95	36	90	28	70	23	57,5	38	95
Intermediário	3	7,5	4	10	4	10	6	15	1	2,5	2	5	1	2,5	1	2,5	6	15	5	12,5	4	10	4	10	1	2,5	0	0	3	7,5	12	30	17	42,5	0	0
Resistente	21	53	2	5	19	47,5	0	0	0	0	1	2,5	21	52,5	0	0	4	10	0	0	1	2,5	0	0	0	0	2	5	1	2,5	0	0	0	0	2	5

5.3.2 Perfil de sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* a antibióticos

Todos os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói apresentaram sensibilidade a Piperaciclina + Tazobactam, Cefotaxidima, Cefepime, Ciprofloxacina, Imipenem e Trobramicina (Tabela 9).

Foi verificada resistência à Gentamicina em um (25%) isolado.

Não houve detecção de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente frente aos antibióticos testados (Apêndice 2).

ALLYDICE-FRANCIS e BROWN, 2012, ao analisarem noventa e cinco amostras de vegetais frescos na Jamaica, dentre os quais 15 amostras eram de alface, isolaram *Pseudomonas aeruginosa* de sessenta amostras de vegetais e catorze amostras de alface. Dentre os isolados obtidos de vegetais, verificaram cepas que apresentam resistência a três (23%), quatro (35%) e cinco (20%) antibióticos. Dois isolados apresentaram resistência a seis antimicrobianos, ambos foram isolados de alface.

5.3.3 Perfil de sensibilidade de *Acinetobacter sp* a antibióticos

Nenhum dos isolados de *Acinetobacter sp* foi sensível à Tobramicina (Tabela 10).

Foi verificada resistência frente aos antibióticos Ampicilina, Amoxicilina/ Ácido Clavulânico e Gentamicina em um isolado (50%) (Apêndice 3).

Carvalho e colaboradores (2017), verificaram que aproximadamente 29.8% das cepas de *Acinetobacter sp* isoladas de alfaces e frutas comercializadas em Portugal eram multirresistentes.

Tabela 9. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ

SENSIBILIDADE	ANTIBIÓTICOS															
	Combinação de β-lactâmicos		Monobactâmicos		Cefalosporina 3ª geração		Cefalosporina 4ª geração		Quinolonas		Carbapenênicos		Aminoglicosídeos			
	PIT		ATM		CAZ		COM		CIP		IPM		GEN TOB			
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Sensível	4	100	3	75	4	100	4	100	4	100	4	100	2	50	4	100
Intermediário	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	0	0
Resistente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25	0	0

Tabela 10. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Acinetobacter sp.* isolados de alfaces minimamente processadas comercializadas na cidade de Niterói/RJ

SENSIBILIDADE	ANTIBIÓTICOS																		
	Penicilina	Combinação de β-lactâmicos			Tetraciclina	Monobactâmicos	Cefalosporina - 2ª geração		Cefalosporina - 3ª geração		Cefalosporina - 4ª geração	Quinolonas	Anfenicóis	Carbapenêmicos		Aminoglicosídeos		Sulfonamidas	
	AMP	APS	AMC	PIT	TET	ATM	CFO	CRX	CTX	CAZ	CPM	CIP	CLO	ERT	IPM	GEN	TOB	SUT	
	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	
Sensível	1 50	2 100	1 50	2 100	2 100	2 100	2 100	2 100	2 100	1 50	2 100	2 100	2 100	1 50	2 100	2 100	0 0	2 100	
Intermediário	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 100	0 0	0 0	
Resistente	1 50	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 50	0 0	0 0	0 0	0 0	

5.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO

5.4.1 Determinação do teor de cloro ativo na água sanitária comercial utilizada para preparo da solução de hipoclorito de sódio

A tabela 11 mostra os volumes obtidos em triplicata na titulação iodométrica da água sanitária utilizada para preparo da solução mãe.

Tabela 11. Volumes de titulante consumidos na titulação iodométrica

Ensaio	Volume (mL)
1	14,35
2	14,40
3	14,40
Média	14,38

Cálculo:

Dados: MM Cl₂ = 70,906 g/mol

mEg = MM / 2000 = 0,035453

$$\% \text{ cloro ativo} = 100 \times [\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] \times V_{\text{tit}} \times \text{meg Cl}_2 \times \frac{V_{\text{balão}}}{V_{\text{amostra}} \times V_0}$$

$$\% \text{ cloro ativo} = 100 \times 0,09706 \times 14 \times 0,035453 \times \frac{250}{25 \times V_0}$$

% cloro ativo = **2,47%**

5.4.2 Perfil de sensibilidade de *Enterobacteriaceae* ao hipoclorito de sódio

Entre os isolados de *Enterobacteriaceae*, houve elevada verificação de resistência à concentração de 50 ppm de cloro ativo com 10 minutos de contato (Tabela 12) e ainda se verificou isolados que apresentaram resistência à mesma concentração com 15 minutos e até 20 minutos de contato.

Também verificou-se resistência em alguns isolados a 100 ppm de cloro ativo com 10 minutos, 15 minutos e 20 minutos (Tabela 12).

A concentração de cloro ativo de 200 ppm mostrou-se eficaz contra todos os isolados de *Enterobacteriaceae* nos tempos 10, 15 e 20 minutos (Tabela 12).

Um isolado de *Enterobacter cloacae*, multirresistente, apresentou resistência ao hipoclorito de sódio na concentração de 100 e 50 ppm nos tempos 10, 15 e 20 minutos. A sensibilidade foi verificada somente frente a 200 ppm nos três tempos distintos.

Nascimento e colaboradores, 2003 relataram redução de coliformes totais de 1,91 log UFC/g após sanitização de alface com hipoclorito de sódio 200 ppm por 15 minutos.

5.4.3 Perfil de sensibilidade de *Pseudomonas sp* ao hipoclorito de sódio

Todos os isolados de *Pseudomonas putida* revelaram-se sensíveis à exposição ao cloro ativo nas concentrações 50 ppm, 100 ppm e 200 ppm pelos tempos de contato de 10, 15 e 20 minutos. Verificou-se que dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa* revelaram elevada resistência ao hipoclorito de sódio, mostrando-se sensíveis somente à concentração de 200 ppm por 15 e 20 minutos (Tabela 13).

Tabela 12. Perfil de sensibilidade de enterobactérias isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ ao hipoclorito de sódio

ISOLADO	TESTE DE SUSPENSÃO								
	10 minutos			15 minutos			20 minutos		
	200	100	50	200	100	50	200	100	50
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella variicola</i>	S	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	R	S	S	R	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter braakii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter braakii</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter asburiae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Raoultella terrigena</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	S	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	R	R	S	R	R	S	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Hafnia alvei</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter braaki</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter braaki</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R

Tabela 13. Perfil de sensibilidade de *Pseudomonas* sp isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ

ISOLADO	TESTE DE SUSPENSÃO								
	10 minutos			15 minutos			20 minutos		
	200	100	50	200	100	50	200	100	50
<i>Pseudomonas putida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas putida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas putida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas fulva</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas putida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas putida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S	R	R	S	R	R

5.4.4 Perfil de sensibilidade de *Acinetobacter* sp ao hipoclorito de sódio

Um dos isolados de *Acinetobacter johnsonii* revelou-se resistente à concentração de 50 ppm por 10 minutos (Tabela 14).

Tabela 14. Perfil de sensibilidade de *Acinetobacter* sp isolados de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ ao hipoclorito de sódio

ISOLADO	TESTE DE SUSPENSÃO								
	10 minutos			15 minutos			20 minutos		
	200	100	50	200	100	50	200	100	50
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S

5.5 CORRELAÇÃO DOS PERFIS DE SENSIBILIDADE DE ANTIBIÓTICOS E HIPOCLORITO DE SÓDIO

Entre os dez isolados de enterobactérias que apresentaram alguma resistência ao cloro, oito (80%) evidenciaram também resistência a, pelo menos, um dos antibióticos testados. Quatro isolados (40%), das espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii* e *Enterobacter cloacae* que apresentaram resistência ao cloro, evidenciaram

multirresistência a antibióticos (Tabela 15). Este resultado corrobora o relatado por Verraes e colaboradores, 2013 de que células estressadas ou danificadas subletalmente, após serem submetidas ao processamento mínimo podem ser induzidas à expressão de resistência antimicrobiana.

Entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* não foi observada correlação direta entre à resistência ao hipoclorito de sódio e aos antibióticos testados, visto que, os isolados que revelaram elevada resistência ao cloro ativo, não evidenciaram resistência a nenhum dos antibióticos testados (Tabela 16). Este resultado vai ao encontro do relatado pelo Organização Mundial da Saúde, que considera *P. aeruginosa* um microrganismo moderadamente resistente ao cloro (WHO, 2003 *apud* MEDEIROS *et al.*, 2007), entretanto, não corrobora a teoria de que bactérias que sobrevivem à cloração apresentam uma relação com multirresistência, indicando que o cloro pode selecionar as linhagens mais resistentes a antibióticos (Pellegrino *et al.*, 2002 *apud* MEDEIROS *et al.*, 2007).

Um isolado de *Acinetobacter johnsonii* que apresentou resistência à concentração de 50 ppm por 10 minutos evidenciou multirresistência antimicrobiana, revelando-se resistente aos antibióticos Ampicilina, Amoxicilina + Ácido Clavulânico e Ertapenem e ainda sensibilidade intermediária a Cefotaxima e a Tobramicina (Tabela 17). Este resultado permite que se faça a correlação entre a resistência ao hipoclorito de sódio e aos antibióticos testados.

Tabela 16. Correlação do perfil de resistência a antibióticos e a hipoclorito de sódio de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de alfaces minimamente processadas comercializadas em Niterói/RJ

AMOSTRA	ISOLADO	ANTIBIÓTICOS							TESTE DE SUSPENSÃO									
		Combinação de β -lactâmicos	Monobactâmicos	Cefalosporina – 3ª geração	Cefalosporina – 4ª geração	Quinolonas	Carbapenêmicos	Aminoglicosídeos	10 minutos			15 minutos			20 minutos			
		PIT	ATM	CAZ	CPM	CIP	IPM	GEN	TOB	200	100	50	200	100	50	200	100	50
M	184 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
	185 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	186 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	189 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R

CONCLUSÃO

- As espécies predominantemente isoladas foram *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*;
- Há necessidade de maior vigilância quanto ao controle de temperatura na cadeia produtiva;
- Piperaciclina + Tazobactam, Tetraciclina, Cefuroxima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina e Trobramicina foram eficazes contra todos os isolados de enterobactérias;
- Piperaciclina + Tazobactam, Ceftazidima, Cefepime, Ciprofloxacina, Imipenem e Trobramicina foram eficazes contra todos os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Tobramicina não foi eficaz contra nenhum dos isolados de *Acinetobacter sp*;
- Multirresistência antimicrobiana foi evidenciada por espécies de *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter braakii* e *Acinetobacter johnsonii*;
- O binômio concentração de cloro ativo x tempo de contato eficaz contra todos os isolados foi 200 ppm por 20 minutos;
- As alfaces minimamente processadas analisadas caracterizam-se pela presença de isolados bacterianos de *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter sp*. com elevada correlação entre a resistência ao hipoclorito de sódio e aos antibióticos testados.
- A mesma correlação não foi verificada entre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

ALEGBELEYE, O.O., SINGLETON I., SANT'ANA A. S., **Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review.** Food Microbiology 73:177-208. August 2018.

ALEKSHUN M. N., LEVY S. B. **Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance.** Elsevier Inc. Cell. 2007 Mar 23;128(6):1037-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>

ALLYDICE-FRANCIS K., BROWN P. D. **Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence. Determinants in Pseudomonas aeruginosa Associated with Fresh Vegetables.** Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Microbiology. Volume 2012, 7 pages. doi:10.1155/2012/426241

ARTÉS, F.; GOMEZ, P.; ARTÉS-HERNANDEZ, F. **Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables.** Stewart Postharvest Review, Montreal, v. 5, p. 2-13, 2006.

BANSAL V., SIDDIQUI M. W., RAHMAN M. S. Chapter 1. **Minimally Processed Foods: Overview.** Washing, Peeling and Cutting of Fresh-Cut Fruits and Vegetables (pp.1-15) Springer International Publishing Switzerland 2015.

BARBOSA V. A. A., FILHO F. C. C., SILVA A. X. L., OLIVEIRA D. G. S., ALBUQUERQUE W. F., BARROS V. C. **Comparação da contaminação de alface (Lactuca sativa) proveniente de dois tipos de cultivo.** Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.10, n.2) p. 231 – 242, abr – jun. 2016

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. **Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(2): 197-201, Maio-Ago. 2001

BERGER, C.N., SODHA, S.V., SHAW, R.K., GRIFFIN, P.M., PINK, D., HAND, P., FRANKEL, G. **Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens.** Environ. Microbiol. 2010 Sep;12(9):2385-97. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02297.

BEUCHAT, L.R. **Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables.** Microbes Infect. 2002 Apr;4(4):413-23.

BRANDÃO M.L., ALMEIDA D.O., BISPO F.C., BRICIO S.M., MARIN V.A., MIAGOSTOVICH M.P.. **Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (Lactuca sativa), Rio de Janeiro State, Brazil.** J Food Sci. 2014 May;79(5):M961-6. doi: 10.1111/1750-3841.12459. Epub 2014 Apr 24.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 12, de 02 de janeiro de 2001.** Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de janeiro, 2001. Seção 1, p.45-53.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 65 de 09/09/2003.** DOU 11/09/2003. Aprova as Diretrizes Gerais do Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal – PNSQV.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Janeiro de 2018

CARNELOSSI, M.A.G.; SILVA, E.O.; CAMPOS, R.S.; SOARES, N.F.F.; MINIM, V.P.R.; PUSCHMANN, R. **Conservação de folhas de couve minimamente processadas.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4, n.2, p. 149-155, 2002

CARVALHEIRA A., SILVA J., TEIXEIRA P. **Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant Acinetobacter spp.** Food Microbiology. Volume 64, June 2017, Pages 119-125

CDC. Center for Disease, Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>. Acesso em 31/07/2018

COSTA, C. P.; SALA, F. C. **A evolução da alfacultura brasileira.** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 23, n. 1, 2005. Verso da capa.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;** Approved Standard Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

DAVIN-REGLI A. and PAGÈS J.M. **Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment.** Front. Microbiol. 6:392. (2015). doi:10.3389/fmicb.2015.00392

OLIVEIRA E. N. A. O., SANTOS D. C. (Organizadores). **Tecnologia e Processamento de Frutos e Hortaliças**. Cap. IV. Processamento de hortaliças. p 71 a 88. Natal: IFRN. 2015 234p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de Segurança e Qualidade na Produção de Alface Minimamente Processada**. Projeto PAS Campo. Convênio. CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA. Brasília: Embrapa/Sede, 2004.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária **Processamento mínimo de produtos hortifrúticos** / SILVA E. O., PINTO P. M., JACOMINO A. P., SILVA L. T. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 71 p. 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184, 139).

FALOMIR, M.P.; RICO, H.; GOZALBO D. **Enterobacter and Klebsiella Species Isolated from Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents**. Foodborne Pathogens and Disease. 2013. Dec;10(12):1002-7. doi: 10.1089/fpd.2013.1552. Epub 2013 Aug 27.

HUSSAIN M.A., GOONERATNE R. **Understanding the Fresh Produce Safety Challenges**. Foods. 2017

KARUMATHIL, D.P.; YIN H., KOLLANOOR-JOHN, A., KUMARVENKITANARAYANAN. **Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria on Fresh Vegetables Collected from Farmers' Markets in Connecticut**. Journal of Food Protection. Vol. 79. 2016.

KLUGE R.A., SILVEIRA A. C., INESTROZA-LIZARDO C., BERNO N. D. **Processamento mínimo de hortaliças: princípios e práticas**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, 2016. 85 p.: il. (Série Produtor Rural, nº 62)

LEFF J. W., FIERER N. **Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables**. Plos One. Volume 8. Mar. 2013.

LEGNANI P. P., LEONI E. **Effect of processing and storage conditions on the microbiological quality of minimally processed vegetables**. International Journal of Food Science and Technology 2004, 39, 1061–1068

MACHADO T.R.M., MALHEIROS P.S., BRANDELLI A., TONDO E.C. **Avaliação de resistência de Salmonella à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio**. Rev. Inst. Adolfo Lutz. São Paulo, 2010; 69(4):475-81

MATTOS LM; MORETTI CL; CHITARRA AB; PRADO MET. **Qualidade de alface crespa minimamente processada armazenada sob refrigeração em dois sistemas de embalagem**. Hortic. Bras., Brasília, v. 25, n. 4, p. 504-508, Dec. 2007.

MEDEIROS L.V., CALAZANS G. M. T., VASCONCELOS U. **Ocorrência de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* cloro resistentes em águas de diferentes origens.** Acta Scientiarum Biological Sciences 29(3). July 2007

NASCIMENTO M.S., SILVA N., CATANOZI M.P.L.M., SILVA K. C. **Effects of Different Disinfection Treatments on the Natural Microbiota of Lettuce.** Journal of Food Protection, Vol.66, Nº.9, 2003, Pages 1697–1700

NASCIMENTO, K.O.; AUGUSTA I. M.; RODRIGUES N. R.; PIRES, T.; BATISTA E.; JÚNIOR J.L.B.; BARBOSA M.I.M.J. **Alimentos minimamente processados: uma tendência de mercado.** Acta Tecnológica, Vol. 9, Nº 1, 48- 6. 2014.

NASCIMENTO, A. R. et al. **Avaliação da sensibilidade de antimicrobianos a cepas de enterobacteriaceae isoladas de amostras de alface (*lactuca sativa*) comercializada na cidade de São Luís-MA.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, [S.l.], dec. 2005. ISSN 19839774. Available at: <<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/4489>>. Acessado em: 29 mai. 2019. doi:<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v23i2.4489>.

NEWELL, D.G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFALL, J., SCHEUTZ, F., VAN DER GIESSEN, J., KRUSE, H. **Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge.** International Journal of Food Microbiology 139 Suppl 1(1):S3-15 · May 2010.

OSAILI T.M., ALABOUDI A.R., AL-QURAN H.N., AL-NABULSI A.A., **Decontamination and survival of Enterobacteriaceae on shredded iceberg lettuce during storage.** Food Microbiology 73, pp 129-136. 2018.

PETER S., et al. **Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*.** BMC Genomics. 2017 Nov 10;18(1):859. doi: 10.1186/s12864-017-4216-2.

SANTOS T.B.A.; JUNQUEIRA N.S.V.C.A.; PEREIRA J.L. **Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas.** Braz. J. Food Technol., Campinas, v. 13, n. 2, p. 141-146, Abr./Jun. 2010

SALA, F.C.; COSTA, C.P. **Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira.** Hortic. Bras., Vitoria da Conquista, v. 30, n. 2, p. 187-194, June 2012.

SEBRAE. **Hortaliças Minimamente Processadas.** Estudos de Mercado. SEBRAE/ESPM. Setembro. 2008

SZABO, E. A.; SCURRAH, K. J.; BURROWS, J. M. **Survey for psychrotrophic pathogens in minimally processed lettuce.** Letters in Applied Microbiology, Oxford v. 30, n. 160, p. 456-460, 2000.

VERRAES, C.; BOXSTAEL S. V.; MEERVENNE E.V.; COILLIE E. V.; BUTAYE P.; CATRY B.; SCHAETZEN M. A.; VAN HUFFEL X.; IMBERECHTS H.; DIERICK K.; DAUBE G.; SAEGERMAN C.; BLOCK J.; DEWULF J.; HERMAN L. **Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review.** Int. J. Environ. Res. Public Health 2013, 10, 2643-2669; doi:10.3390/ijerph10072643

VOGEL A.I., MENDHAM J., DENNEY R.C., BARNES J.D., THOMAS M. **Análise química quantitativa.** 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008

WHO, World Health Organization. **Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases.** Disponível em http://www.who.int/nutrition/topics/5_population_nutrient/en/. Acessado em 19 set 2017.

WHO, World Health Organization. **Health statistics and information systems.** Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY). Disponível em http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/. Acessado em 19 set 2017.