



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

JEFERSON LEANDRO DE PAIVA

Avaliação microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) em sistema de cultivo hidropônico e no solo, correlacionando os microrganismos isolados com os encontrados em toxinfecções alimentares em municípios da região Noroeste de São Paulo - SP.

São José do Rio Preto

2011

JEFERSON LEANDRO DE PAIVA

Avaliação microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) em sistema de cultivo hidropônico e no solo, correlacionando os microrganismos isolados com os encontrados em toxinfecções alimentares em municípios da região Noroeste de São Paulo - SP.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Biológicas junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto

2011

Paiva, Jeferson Leandro de.

Avaliação microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) em sistema de cultivo hidropônico e no solo, correlacionando os microrganismos isolados com os encontrados em toxinfecções alimentares em municípios da região Noroeste de São Paulo – SP / Jeferson Leandro de Paiva. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

115 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Alimentos – Contaminação. 3. Alface – Cultivo. 4. Hidroponia. I. Hoffmann, Fernando Leite. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.67

Jeferson Leandro de Paiva

Avaliação microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) em sistema de cultivo hidropônico e no solo, correlacionando os microrganismos isolados com os encontrados em toxinfecções alimentares em municípios da região Noroeste de São Paulo - SP.

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann
Professor Assistente Doutor
IBILCE-UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
Professor Doutor
IBILCE-UNESP - São José do Rio Preto

Prof^a. Dra. Maria Luiza Silva Fazio
Professora Doutora
IMES - Catanduva

São José do Rio Preto, 28 de abril de 2011.

**“Dedico este trabalho a minha família, em especial
a minha esposa Maria Tereza do Prado Fernandes Paiva
e minha filha Maria Eduarda Fernandes Paiva”**

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por trilhar meus caminhos.

A meus pais, Devanil de Paiva e Railda Alves de Souza Paiva, pelo seu amor incondicional, carinho, amizade, força. Amo-lhes muito!

Aos meus sobrinhos Leonardo de Sousa Paiva e Lara Beatriz Ferreira Fernandes, pelo carinho e por fazerem parte da minha vida.

Amigo, pai, mãe acho que de tudo um pouco é como defino meu mestre, Fernando Leite Hoffmann é mais que orientador porque não corrige apenas o errado ou melhora o que está certo, caminha lado a lado dos orientados com maestria ao mundo da sabedoria.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação, por terem transmitido valiosos conhecimentos.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, Prof^a. Dra. Marcia Luzia Rizzatto, Prof. Dr. Roberto da Silva, Prof^a. Dra. Maria Luiza Silvia Fazio pelo aceite para a composição da banca.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Prof^a. Dra. Paula Rahal.

À Fundação Educacional de Fernandópolis, junto à direção administrativa e amigos de trabalho.

A todos os horticultores e ao dono do restaurante que autorizaram a realização desta pesquisa, em especial ao Sr. Wilson Silva Moysés pela paciência e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de Mestrado e a Tânia Maria Vinturim Gonçalves, nosso braço direito do laboratório.

À Juliano Borsato Moysés, pela amizade e companheirismo.

À minha irmã Eliane Cristina de Paiva, meus cunhados Marcio Vagner de Sousa, Paulo Henrique Fernandes do Prado, minha concunhada Margarete Ferreira Fernandes, sogro Emilio Fernandes Martins e sogra Tereza Mamede do Prado Fernandes pelo apoio e confiança.

Os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão dessa pesquisa. Saibam que essa Vitória é nossa!

RESUMO

A coleta da alface (*Lactuca sativa*) e da água de manejo foi realizada no local de cultivo, tanto pelo método de hidroponia (CH) como pelo tradicional no solo (CT) em estabelecimentos hortifrutigranjeiros e restaurante (R) localizados em cidades da região noroeste paulista. As vinte e cinco amostras analisadas foram coletadas em dias alternados, sendo cinco amostras de cada local. As análises foram realizadas com objetivo de verificar se a origem das toxinfecções alimentares envolvendo pratos que contenham alface é proveniente de microrganismos do local de produção das hortaliças. Os resultados obtidos possibilitaram analisar a ocorrência de contaminação cruzada com outras hortaliças enxaguadas no mesmo tonel e comparar o índice de contaminação dos dois tipos de sistema de cultivo. As análises microbiológicas seguiram as metodologias tradicionais descritas por Silva; Junqueira e Silveira (2001), de acordo com a American Public Health Association. Os resultados das análises mostraram grande variação na contagem dos microrganismos. Nas amostras de alface 92% (23) apresentaram crescimento de coliformes totais variando entre 0,4 a ≥ 240 NMP/g dos quais 40% (10) CT, 32% (8) CH, 20% (5) R; 32% (8) apresentaram coliformes termotolerantes variando entre 0,9 a 46 NMP/g, sendo 24% (6) CT e 8% (2) R; 36% (9) apresentaram *Staphylococcus* coagulase positiva, onde 12% (3) apresentaram crescimento acima dos parâmetros estabelecidos 5×10^3 UFC/g, sendo 4% (1) CT e 8% (2) CH. Todas as amostras positivas para coliformes termotolerantes estão dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA (BRASL, 2001) de 10^2 UFC/g. Nenhuma amostra foi positiva para *Salmonella* spp, atendendo os parâmetros estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2001) de ausência em 25g do produto. Os resultados obtidos nas análises da água foram de 95% (19) apresentando coliformes totais variando entre 2,2 a >16 NMP/100mL, sendo 50% (10) CH, 45% (9) CT; 25% (5) apresentaram coliformes termotolerantes variando entre 2,2 a 16 NMP/100mL, sendo todas de CT; todas apresentaram microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras acima dos parâmetros estabelecidos conforme a Portaria MS nº518/2004 (BRASIL, 2004), que determina ausência de coliformes totais, coliformes termotolerantes e apenas 500UFC/mL de bactérias heterotróficas, contudo apenas 5% (1) apresentou-se dentro dos padrões, sendo de CT. Foi isolada uma cepa de *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) de soro Polivalente A de amostra de água de CT. Nenhuma das análises realizadas revelou crescimento para microrganismos aeróbios psicrotrófilos. Nas análises parasitológicas da água 15% (3) não apresentaram parasitas de vida livre, sendo 5% (1) CT e 10% (2) CH; Na alface 5% (1) não apresentaram parasitas de vida livre, sendo de CH; 10% (2) apresentaram parasita enteropatogênico ao homem, sendo de CT. Entre os 100% (22) das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva submetidas ao teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos 68,18% (15) apresentaram resistência intermediário a algum antimicrobiano e 72,27% (17) apresentaram resistência a algum antimicrobiano. De acordo com os resultados apresentados, os microrganismos envolvidos em toxinfecções alimentares podem ser provenientes do local de cultivo, sendo a água uma via importante de contaminação e o treinamento funcional, manejo de cultivo são imprescindíveis para o controle microbiológico. O sistema de cultivo hidropônico demonstra melhores condições higiênico-sanitárias.

Palavras-chave: Hortofrutigranjeiro; Alface (*Lactuca sativa*), Análise microbiológica, Análise parasitológica, Toxinfecção alimentar, microrganismos e saúde.

ABSTRACT

The collect of lettuce (*Lactuca sativa*) and the water used to grow it was made in the local of its cultivation through both hydroponics (CH) and the traditional in the soil (CT) methods in fruit/vegetable/poultry stores and restaurants (R) localized in the cities of the Paulista northwest region. The twenty-five samples analyzed were collected in alternate days, being five samples from each place. The analyses were carried out with the target to check if the origin of food toxoinfection involving dishes that have lettuce is from microorganisms of the local where the vegetables are cultivated. The results obtained enabled to analyze the occurrence of contamination crossed with other vegetables rinsed in the same cask. Besides, to compare the rate of contamination of the two kinds of cultivation. The microbiological analyses followed the traditional methodologies written by Silva; Junqueira e Silveira, (2001), according to the American Public Health Association. The results of the analyses showed a great variation on the count of the microorganisms. In the lettuce samples 92% (23) presented growing of total coliforms varying between 0, 4 to ≥ 240 NMP/g from which 40% (10) CT, 32% (8) CH, 20% (5) R; 32% (8) presented thermotolerant coliforms varying between 0,9 to 46 NMPg, being 24% (6) CT and 8% (2) R. 36% (9) presented coagulase-positive *Staphylococcus*, where 12% (3) presented growing over the parameters established 5×10^3 UFC/g, being 4% (1) CT and 8% (2) CH. All the positive samples for thermotolerant coliforms are inside the limits established by ANVISA (BRASIL, 2001) of 10^2 UFC/g. No sample was positive for *Salmonella* spp, attending the parameters established by ANVISA (BRASIL, 2001) of absence in 15g of the product. The results obtained from the analyses of the water were from 95% (19) presented total coliforms varying between 2.2 to > 16 NMP/100ml, being 50% (10) CH, 9 (45%) CT; 25% (5) presented thermotolerant coliforms varying between 2.2 to 16 NMP/100ml, being all of them from CT; 100% (20) presented aerobic mesophyllous microorganisms and mold and yeast over the parameters established according to the Administrative Rule MS n^o 518/2004 (BRASIL, 2004), which determines the absence of total coliforms, thermotolerant coliforms and only 500FC/ml of heterotrophic bacteria, however only 5% (1) presented in the patterns, being the CT. It was isolated a strain of *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) of *Polyvalent Serum A* of sample of water of CT. None of the analyses carried out revealed growing for the psychrotrophic aerobic microorganisms. In the parasitological analyses of the water 15% (3) did not present free-life parasites, being 5% (1) CT and 10% (2) CH; In the lettuce 5% (1) did not present free-life parasites, being of CH; 10% (2) presented parasites antheropathogenic to man, being of CT. Between the 100% (22) *Escherichia coli* and coagulase-positive *Staphylococcus* strains submitted to the sensitivity test to antimicrobial agents 68.18% (15) presented intermediate resistance to some antimicrobial and 72.17% (17) presented resistant to some antimicrobial. According to the results presented, the microorganism involved in food toxoinfections can come from the local of the cultivation, being the water an important way of contamination and the functional training and the form of cultivation are vital for the microbiological control. The hydroponic cultivating system shows better sanitary-hygienic conditions.

Key-words: Fruit/vegetable/poultry, Lettuce (*Lactuca sativa*), Microbiological analysis, Parasitological analysis, Food toxoinfection, Microorganisms and health

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representa o percentual das amostras de alface com níveis elevados de coliformes totais, conforme os parâmetros estabelecidos de 3NMP/g, referente a dietas enterais na RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).....	74
Figura 02	Percentual de amostra de água, fora dos limites estabelecidos conforme a Portaria MS nº518/2004 (BRASIL, 2004).....	76
Figura 03	Análise dos resultados de coliformes termotolerantes provenientes das alfaces que apresentaram dentro dos parâmetros estabelecidos de 10 ² NMP/g, conforme a RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).....	78
Figura 04	Percentual de amostra de água, fora dos limites estabelecidos conforme a Portaria MS nº518/2004 (BRASIL, 2004).....	79
Figura 05	Representa o percentual de amostras com <i>E. coli</i> , comparada com a confirmação de <i>E. coli</i> diarreiogênica..	81
Figura 06	Representa os resultados da contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos das amostras de alface fora dos parâmetros estabelecidos de 10 ⁶ UFC/g.....	83
Figura 07	Representa os resultados da contagem de Bolores e Leveduras das amostras de alface fora dos parâmetros estabelecidos de 10 ⁶ UFC/g.....	84
Figura 08	Representa o percentual de amostras de água com contagem de microrganismos heterotróficos dentro dos parâmetros pela Portaria nº 518/2004.....	85
Figura 09	Representa o percentual de amostra com crescimento para <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, comparados conforme os parâmetros estabelecidos de 5x10 ³ UFC/g, o mesmo estabelecido a sanduíches frios e similares, de acordo com ANVISA (BRASIL, 2001).....	87
Figura 10	Sistema de cultivo Tradicional no solo.....	112
Figura 11	Água de enxágüe das hortaliças.....	112

Figura 12	Sistema de cultivo Hidropônico.....	113
Figura 13	Processo de colheita e embalagem das hortaliças em cultivo hidropônico.....	113
Figura 14	Cadastro e verificação das condições de transporte das amostras no Laboratório Escola de Análises Clínicas - FEF.....	114
Figura 15	Tubos múltiplos para análises de coliformes totais e coliformes termotolerantes em alface e sua água de enxágüe.....	114
Figura 16	Identificação de <i>Escherichia coli</i> pelo método tradicional de contagem.....	115
Figura 17	Teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disc-difusão.....	115
Figura 18	Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i> à esquerda e a direita uma larva de vida livre.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Composição físico-química da alface.....	22
Tabela 02	Resultados das análises dos microrganismos coliformes totais, coliformes termotolerantes, <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e <i>Salmonella</i> spp, pesquisados na alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	70
Tabela 03	Resultados das análises dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrótróficos e bolores e leveduras, pesquisados na alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	71
Tabela 04	Resultados das análises microbiológicas da água de lavagem das hortaliças.....	72
Tabela 05	Distribuição numérica e percentual dos microrganismos isolados das hortas e restaurante de municípios da região noroeste do Estado de São Paulo, submetidos a teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	89
Tabela 06	Distribuição do percentual do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de hortas e restaurante de municípios da região noroeste do Estado de São Paulo.....	90
Tabela 7 -	Distribuição do percentual do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de <i>Escherichia coli</i> isolados de hortas e restaurante de municípios da região noroeste do Estado de São Paulo.....	91
Tabela 08	Análises parasitológicas das amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	93
Tabela 09	Análises parasitológicas das amostras da água de lavagem das hortaliças.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

µl	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análises de Perigos em Pontos Críticos de Controle
BHI	Brain Heart Infusion
Ca	Cálcio
CDC	Center of Disease Control
CH	Cultivo Hidropônico
CT	Cultivo Tradicional no solo
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de verotoxina
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
H ₂ S	Sulfito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
ICMSF	Internacional Commission of Microbiological Specifications for Foods
K	Potássio
Kcal	Quilocalorias
KOH	Hidróxido de potássio
LIA	Agar Lisina Ferro
LST	Caldo Lauril sulfato Triptona de Soja
mg	Miligramas
Mg	Magnésio
mL	Mililitro
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio

N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NFT	Fluxo Laminar de Nutrientes
NMP/g	Número Mais Provável por grama
NMP/mL	Número Mais Provável por mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
PCA	Agar Padrão para Contagem
PDA	Agar Batata Dextrose
pH	Potencial Hidrogeniônico
S	Enxofre
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SS	Agar Salmonella-Shigella
TSI	Agar Tríplice Açúcar Ferro
TT	Caldo Tetrionato
UAN	Unidades de Alimentação e Nutrição
UFC/g	Unidade Formadora de Colônias por grama
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por mililitro
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
VB	Caldo ou Agar Verde Brilhante Bile
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges Proskauer
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	GERAIS	21
2.2	ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	PRODUÇÃO, CONSUMO E CONTAMINAÇÃO DA ALFACE (LACTUCA SATIVA).....	22
3.2	SISTEMA DE CULTIVO TRADICIONAL NO SOLO E ORGÂNICO	33
3.3	SISTEMA DE CULTIVO HIDROPÔNICO.....	35
3.4	ÁGUA	37
3.5	MICROORGANISMOS ANALISADOS	38
3.5.1	ColiformesTotais	38
3.5.2	Coliformes Termotolerantes	39
3.5.3	Salmonella ssp.	40
3.5.4	Staphylococcus coagulase positiva	41
3.5.5	Aeróbios Mesófilos	43
3.5.6	Bolores e Leveduras	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS	45
4.2	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	46
4.3	PREPARAM DAS AMOSTRAS	46
4.4	METODOLOGIA DOS MICROORGANISMOS ANALISADOS.....	48
4.4.1	Contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos ...48	
4.4.2	Contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras.	49
4.4.3	Contagem direta em placas de Staphylococcus coagulase positiva	49
4.4.4	Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes	51
4.4.4.1	Teste presuntivo	51
4.4.4.2	Teste confirmativo para coliformes totais	51
4.4.4.3	Teste confirmativo para coliformes termotolerantes	52
4.4.4.4	Contagem de <i>E. coli</i> pelo método tradicional	52

4.4.4.5	Pesquisa de <i>E. coli</i> diarreio gênica.....	53
4.4.5	Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	54
4.4.5.1	Enriquecimento em caldo seletivo	54
4.4.5.2	Confirmação preliminar das colônias típicas de <i>Salmonella</i> spp.	55
4.5	MÉTODO DE DISCO-DISFUSÃO	55
4.6	ANÁLISE PARASITOLÓGICA	56
4.7	ROTEIRO DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS	57
4.7.1	Roteiro das análises microbiológicas da alface	57
4.7.2	Roteiro das análises microbiológicas da água	63
4.7.3	Roteiro das análises parasitológica da alface	67
4.7.4	Roteiro das análises parasitológica da água	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	68
5.1.1	Coliformes totais	73
5.1.1.1	Análise de coliformes totais na alface.....	73
5.1.1.2	Análise de coliformes totais da água	75
5.1.2	Análise de coliformes termotolerantes	76
5.1.2.1	Análise de coliformes termotolerantes na alface	76
5.1.2.2	Análise de coliformes termotolerantes da água	78
5.1.3	Pesquisa de <i>E. coli</i> diarreio gênicas	80
5.1.4	Análise dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras	81
5.1.4.1	Análise dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras das amostras de alface	81
5.1.4.2	Análise dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras das amostras de água	84
5.1.5	Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	86
5.1.6	Determinação de <i>Salmonella</i> spp.	88
5.1.7	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	89
5.2	ANÁLISE PARASITOLÓGICA	92
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ANEXOS

ANEXO A - Fotos das hortas de sistema de cultivo tradicional no solo.....	112
ANEXO B - Fotos das hortas de sistema de cultivo hidropônico.....	113
ANEXO C - Fotos de algumas das análises microbiológicas realizadas na referente pesquisa.....	114
ANEXO D - Fotos de algumas das análises parasitológicas realizadas na referente pesquisa.....	115

1 INTRODUÇÃO

A expansão demográfica e/ou índice populacional, junto com a tendência de mudança no hábito alimentar do consumidor, trouxe um aumento no consumo das hortaliças. Este público é exigente, o que torna necessário produzi-la em quantidade e qualidade o ano inteiro.

Contudo, é notório o aumento de restaurantes do padrão *self-service*, carrinhos de lanche e lanchonetes, e neles a presença de vegetais, principalmente os folhosos, destacando entre eles a alface, devido às propriedades terapêuticas e a quantidade de fibras presentes nesta folhosa.

No setor de produção, além de aperfeiçoarem as técnicas de cultivo, ocorreu um aumento na quantidade de estabelecimentos hortifrutigranjeiro tanto os que cultivam utilizando o método tradicional no solo, como os de cultivo pela técnica de hidropônia.

Considerando o interesse pelo consumo alimentar de folhosos crus e a preocupação com a qualidade microbiológica, devido à maioria das toxinfecções alimentares serem por causa do manuseio no processamento e conservação dos alimentos, a presente pesquisa têm o objetivo de verificar se os microrganismos causadores de toxinfecções alimentares envolvendo pratos que contenham alface são da mesma espécie ou se são os mesmos encontrados durante o processo de produção. Lembramos que o uso de antibiótico em ração de animais (bovinos, eqüinos, etc) leva a seleção de cepas resistentes que podem estar causando esta infecção, pois os dejetos desses animais são utilizados em sua maioria como adubo nas hortas para produção de alface, entre outras hortaliças.

As análises seguem a Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2001), onde estabelece que hortaliças cruas, preparadas para o consumo direto, não devem apresentar *Salmonella* spp/25g do produto e Coliformes Termotolerantes acima de 10^2 UFC/g.

Considerando as amostras pesquisadas utilizou-se como tolerância a quantidade de microrganismos *Staphylococcus* coagulase positiva em 5×10^3 UFC/g, o mesmo estabelecido a sanduíches frios e similares, já que não existem padrões destes para alface. A avaliação de microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios

psicrotróficos, bolores e leveduras foram realizadas como complemento à avaliação das condições higiênico-sanitárias, conforme recomendado pela International Commission of Microbiological Specifications for Foods – ICMSF (1978) e Leitão (1981).

Levando em conta as características do produto em estudo e a falta de padrões para os mesmos “in natura” e prontos para consumo, foi adotado como parâmetro para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotófilos, bolores e leveduras a tolerância de até 10^6 UFC/g, de acordo com Almeida (2006).

A pesquisa possibilita também analisar a ocorrência de contaminação cruzada com outras hortaliças enxaguadas no mesmo tonel de água o qual não contém nenhum tipo de tratamento. Foi realizada também a análise parasitológica das amostras devido ao ambiente propício.

Os resultados das análises das hortaliças permitem comparar o índice de contaminação microbiológica entre os sistemas de cultivo hidropônico e tradicional no solo.

Todas as análises juntas fornecem dados recentes aos órgãos competentes que podem utilizá-los para orientar os proprietários, garantindo uma alimentação mais saudável e rica a população.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Avaliar se os casos de toxinfecções alimentares envolvendo esta hortaliça podem ser provenientes de microrganismos isolados no local de seu cultivo.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Detectar possíveis microrganismos patogênicos na alface;
2. Comparar os sistemas de cultivo hidropônico e tradicional (solo) quanto à quantidade de microrganismos;
3. Verificar a ocorrência de contaminação cruzada através da análise da água de enxágüe das hortaliças;
4. Avaliar se os microrganismos isolados podem ser os mesmos causadores de toxinfecções alimentares, através da sorotipagem das cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO, CONSUMO E CONTAMINAÇÃO DA ALFACE (*LACTUCA SATIVA*)

A alface (*Lactuca sativa*), pertencente à família *Asteraceae*, é uma planta originária da Ásia e trazida para o Brasil pelos portugueses no século XVI. Atualmente, constitui o grupo de hortaliças folhosas de maior consumo no Brasil, sendo rica, principalmente, em vitaminas (A1, B1, B2 e C) e minerais como o ferro e o fósforo (FILGUEIRA, 2000; MENEZES, SANTOS e SCHMIDT, 2001).

O aproveitamento dos nutrientes da alface é favorecido por ser consumida crua, destacando-se seu elevado teor em pró-vitamina A, que alcança 4.000 UI em 100 g de folhas verdes (cerca de quatro vezes o teor do tomate), sendo, porém, bem mais baixo nas folhas internas brancas das alfaces repolhudas. A produção de alface no Brasil é restrita ao mercado nacional e, devido à perecibilidade do produto, as regiões de plantio se situam normalmente próximas ao mercado consumidor (PESAGRO, 2001). A tabela 1 apresenta os principais compostos e seus valores na quantidade de 100g da hortaliça.

Tabela 1 - Composição físico-química da alface.

NUTRIENTE	QUANTIDADE
Calorias (Kcal)	16
Glicídios (g)	2,3
Proteínas (g)	1,2
Lipídios (g)	0,2
Cálcio (mg)	38
Fósforo (mg)	42
Ferro (mg)	1,1
Vitamina A (mcg)	102
Tiamina (mcg)	110
Riboflavina (mcg)	60
Niacina (mg)	0,2
Vitamina C (mg)	7,6
Umidade (%)	95

FONTE: IBGE, 1997.

Quanto à sua estrutura, a alface é uma planta delicada, com caule diminuto, no qual se prendem as folhas. Estas por sua vez são amplas e crescem em volta do caule (em roseta). Conforme a variedade, a coloração pode ocorrer em vários tons de verde e roxo e o sistema radicular é muito ramificado e superficial (FILGUEIRA, 2000). As variedades existentes pertencem a diferentes grupos varietais, com folhas lisas, folhas crocantes e grossas fechando-se em cabeças e com folhas crespas sem formação de cabeça (BLANCO; GROppo e TESSARIOLI,1997).

Os avanços em técnicas agrônômicas permitem à produção industrial fornecer quase todos os tipos de hortaliças de alta qualidade durante o ano todo e, dentre as hortaliças de grande consumo no Brasil, encontra-se a alface (*Lactuca sativa*): sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido e sua forma predominante de comercialização é *in natura* (SOARES e CANTOS, 2006).

Embora seja reconhecida como planta típica de clima temperado, a alface foi melhorada geneticamente apresentando maior tolerância às temperaturas elevadas, o que possibilita seu cultivo todo o ano; no entanto, existem dois períodos climáticos pouco favoráveis ao seu cultivo. O primeiro ocorre nos meses de inverno, em que temperaturas inferiores a 10 °C retardam o crescimento (SEGOVIA et al., 1997). O segundo período refere-se ao verão, caracterizado por altas temperaturas, que atingem 30 °C durante o dia, e que provocam o encurtamento do ciclo vegetativo, induzindo as plantas ao florescimento prematuro e depreciando, conseqüentemente, a qualidade da alface. Segundo Jackson et al. (2009), temperaturas muito elevadas podem favorecer a formação de cabeças pouco compactas e, também, contribuir para a ocorrência de deficiência de cálcio, conhecido como "tipburn"; também, a ocorrência de chuvas de verão dificulta a produção e obtenção de folhas tenras e bem formadas.

Segundo Knott (1962), as temperaturas do ar mais favoráveis ao crescimento e produção de alface se situam entre 15 e 24 °C, sendo a mínima de 7 °C. Jackson et al.(2009) concluíram que a alface americana requer, como temperatura ideal para o desenvolvimento, 23 °C durante o dia e 7 °C à noite. Afirmando que temperaturas acima de 40 °C retardam gradativamente a absorção de nutrientes, enquanto a maior absorção é conseguida entre 25 e 30 °C.

Decorrente da sensibilidade da planta às intempéries e às variações climáticas, o seu cultivo em ambiente protegido vem ganhando grande importância nos últimos anos. Além da praticidade no manejo, a limpeza e a versatilidade desta modalidade de cultivo conferem ótimas condições para reduções na utilização de produtos químicos, menor consumo de água, produção fora de época, maior produtividade e, conseqüentemente, melhor preço, devido à alta qualidade do produto (CASTELLANE e ARAÚJO, 1994; FAQUIN; FURTINI e VILELA, 1996; RESH, 1997; PAIVA, 1998).

O consumo de hortaliças tem aumentado não só pelo crescente índice populacional, mas também pela tendência de mudança no hábito alimentar do consumidor, tornando-se inevitável o aumento da produção. Por outro lado, o consumidor de hortaliça tem se tornado mais exigente, havendo necessidade de produzi-la em quantidade e qualidade, bem como manter o seu fornecimento o ano todo. Devido a essa tendência do mercado hortícola é que o cultivo protegido (túneis e estufas) vem aumentando a cada ano, assim como o cultivo hidropônico. Esse sistema, apesar de recente no país, tem apresentado um acréscimo no número de usuários, principalmente próximo aos grandes centros consumidores (OHSE; NETO e MARFROM, 2001).

A alface (*Lactuca Sativa*) é a planta cultivada em maior escala pela Técnica do NFT (*Nutrient Film Technique* ou fluxo laminar de solução). Isso se deve à sua fácil adaptação ao sistema, no qual tem revelado alto rendimento e reduções de ciclo em relação ao cultivo no solo. As hortaliças folhosas são recomendadas na dieta alimentar de pessoas em tratamento da obesidade e de doenças crônico-degenerativas (doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e câncer) por apresentarem baixo valor calórico, ampliando, com isso, seu mercado. A importância da alface na alimentação e saúde humana se destaca por ser fonte de vitaminas e sais minerais, constituindo-se na mais popular dentre aquelas em que as folhas são consumidas. Seu consumo é feito *in natura*, e nessas condições apresenta a seguinte composição média, por 100 g: água: 94%; valor calórico: 18 Kcal; proteína: 1,3 g; extrato etéreo: 0,3 g; carboidratos totais: 3,5 g; fibra: 0,7 g; cálcio: 68 mg; fósforo: 27 mg; ferro: 1,4 mg; potássio: 264 mg; tiamina: 0,05 mg; riboflavina: 0,08 mg; niacina: 0,4 mg; vitamina C: 18,0 mg, segundo Sgarbieri (1987), para alface produzida no solo (OHSE; NETO e MARFROM, 2001).

O alimento deve satisfazer às exigências de qualidade do consumidor, possuindo adequado valor nutricional, aparência, além de boas condições de higiene e sanidade. No entanto, estatísticas mostram que em praticamente todas as partes do mundo existe elevado número de casos de enfermidades transmitidas por alimentos. Mesmo em países com elevado padrão de vida, doenças alimentares têm contribuído para o aumento da taxa de doenças infecciosas (EVERS, 1996).

Alimentos contaminados com germes patogênicos podem apresentar aparência, sabor e odor normais. Os alimentos crus, comercializados em feiras-livres e mercados públicos, podem levar microrganismos causadores de toxinfecções para dentro da cozinha, contaminando direta ou indiretamente os alimentos já processados, através das mãos dos manipuladores, superfícies e equipamentos (HOBBS; ROBERTS, 1999).

Os surtos de toxinfecções alimentares são uma preocupação mundial. Calcula-se que de 1 a 100 milhões de pessoas no mundo contraem toxinfecções decorrentes do consumo de alimentos e água anualmente (GERMANO et al., 2000; MOSSEL; JANSEN e STRUIJK, 1999). Apesar de exaustivos esclarecimentos sobre higiene dos alimentos visando à prevenção de doenças de origem alimentar, a incidência de surtos e casos esporádicos de toxinfecções continua a crescer. Nos Estados Unidos, o CDC (Center of Disease Control) registrou 103 surtos de toxinfecção entre 1973 e 1991, atingindo cerca de 6082 pessoas (EVERS, 1996). A situação tende a ser mais grave em países em desenvolvimento como o Brasil, nos quais as condições precárias de infra-estrutura e educação sanitária facilitam a proliferação desta problemática. Além do risco à saúde da população, este quadro gera também perdas econômicas tendo em vista que as toxinfecções alimentares, muitas vezes, ocasionam o afastamento do indivíduo de seu trabalho, dentre outras conseqüências.

Segundo Brackett (1999), durante muito tempo atribuiu-se a responsabilidade de assegurar a qualidade microbiológica de alimentos aos aspectos envolvidos com o processamento do mesmo. No entanto, atualmente, todas as etapas, que vão desde a produção até o consumo do alimento, devem ser consideradas de extrema importância para a qualidade final do produto. Dentro deste universo de fatores, grande parte dos problemas estão ligados a descuidos com a saúde dos manipuladores, falta de higiene no manuseio e ausência de preservação adequada dos alimentos (SILVA Jr, 1996).

Apesar da importância que os grandes supermercados vêm assumindo na comercialização de alimentos, os mercados e feiras livres continuam a ocupar posição de destaque neste setor, sobretudo em bairros periféricos, nos quais a existência destes magazines é menor. Em pesquisa conduzida por Oliveira; Valente (2000), as feiras-livres são citadas como um dos principais locais de aquisição de alimentos por 35,2% dos entrevistados com renda entre 10 e 20 salários mínimos.

Coli; Perez e Freitas (1998), afirmam que apesar da experiência obtida ao longo dos últimos quarenta anos no que tange a identificação de problemas ligados à contaminação de alimentos, capacitação de pessoal e desenvolvimento de estratégias de controle, os danos à saúde e os reflexos econômicos causados pela incorreta manipulação de alimentos continuam presentes, sobretudo na América Latina e Caribe. Esta mesma posição é defendida por Blaha (1999), o qual afirma que novos enfoques mostram-se necessários atualmente, incluindo a pesquisa de patógenos emergentes envolvidos em toxinfecções alimentares. O autor acredita também que os consumidores dos dias de hoje estão preocupados em adquirir alimentos não só atrativos e saborosos, mas também seguros e em consonância com boas práticas com o meio ambiente, tendo a mídia papel decisivo na disseminação destas informações. Fatores como altos custos gerados pelas recomendações oficiais, além da interpretação variada das normas de inspeção podem contribuir de maneira significativa com as irregularidades ainda existentes nas empresas alimentícias.

Diante do observado, fica claro que o fator desencadeante de todos estes problemas relatados é a falta de educação sanitária e noções mínimas de higiene pessoal e manipulação dos alimentos. Alguns manipuladores de alimentos não sabem ler e escrever, freqüentemente não demonstrando consciência do perigo associado às contaminações biológicas e não reconhecendo a importância de hábitos simples, como a necessidade de lavar as mãos antes e depois de se manipular gêneros alimentícios crus, assim como após as visitas ao banheiro. Estudos desenvolvidos por Mossel; Jansen e Struijk (1999) comprovam que condições ótimas de segurança na produção de alimentos podem ser obtidas mediante treinamento adequado dos colaboradores.

Germano et al. (2000), em sua análise sobre a regulamentação da ocupação de manipulador de alimentos, afirma que a legislação por si só não pode garantir a inocuidade dos alimentos, fazendo-se necessária a criação de programas de

treinamento específicos visando a prevenção da contaminação. É importante a manutenção das boas práticas de higiene ao longo de toda a cadeia alimentar, incluindo tanto a educação dos consumidores quanto à correta utilização dos alimentos.

O apelo por alimentos frescos, de baixas calorias, saudáveis, nutritivos e de alta qualidade é cada vez maior. Os consumidores vêm modificando seus hábitos alimentares e cada vez mais se tornam conscientes da relação entre dieta e prevenção de doenças. No Brasil, este nicho de mercado começou a ser explorado em 1994 e em apenas um ano cresceu 68,9% em volume consumido no varejo do país e em 1996 movimentou cerca de R\$ 400 milhões em vendas segundo dados de Nielsen Consultoria (JORNAL DO BRASIL, 21/06/97).

Como resultado, o mercado tem aumentado rapidamente a demanda na procura não apenas por hortaliças folhosas, mais sim por leguminosas e frutas minimamente processadas (descascamento, corte, etc.) segundo Rolle; Chism III (1987).

Skura; Powrie, (1995); Shewfelt; Heaton e Batal (1987). relatam que a sobrevivência destes produtos no mercado está em função do controle microbiológico e manutenção dos atributos de qualidade dos mesmos, exemplo: aparência, sabor, odor, textura, valor nutritivo, ser de cor aceitável e razoavelmente livre de defeitos.

A qualidade e a segurança de produtos frescos dependem de sua microbiota. Cada etapa percorrida entre o produtor e o consumo final influenciará a microbiologia do produto. Manuseio, armazenagem e transporte incorretos podem comprometer a qualidade e a segurança do produto favorecendo o aumento da população de microrganismos (BRACKETT, 1992).

Baixas temperaturas retardam a respiração e a transpiração de frutas e hortaliças frescas. Assim sendo, durante o transporte, armazenamento e exposição nos pontos de venda, o controle da temperatura deve ser eficaz, fazendo-se desse monitoramento, a técnica disponível mais usual e importante na minimização dos efeitos dos abusos (machucaduras, danos mecânicos) provocados em frutas e hortaliças minimamente processadas (BRECHT, 1995).

O uso de embalagem não elimina a necessidade de refrigeração ou a de um programa efetivo no controle de deterioração, nem retarda todas as mudanças bioquímicas associadas com a senescência dos tecidos. Ela fornece uma razoável

segurança durante o transporte dos produtos, reduzindo danos mecânicos por abrasão e compressão, ajudando a resguardar a alta qualidade de tais produtos (WILEY, 1994).

Nos vegetais a microbiota dominante é formada por microrganismos provenientes do solo (CANTWELL, 1992).

Segundo Brackett (1992), todas as bactérias patogênicas podem ser encontradas em produtos pré-cortados (hortaliças, frutas, etc.), incluindo a microbiota mesofílica, bactérias ácido-lácticas, coliformes fecais, bolores, leveduras e uma microbiota pectonolítica. Entretanto, o tipo e a população diferem com o tipo de produto, práticas de cultivo e a sanificação (WATADA; MINOTT, 1996).

O Código de Defesa do Consumidor, lei 8.078 de 11.9.1990, considera o consumidor como “hipossuficiente” (art.4º, I), determinando, ainda, em seu arts. 12 e 13 a inversão do ônus da prova, ou seja, caberá ao fornecedor provar sua inocência. O art. 18 preceitua que “os fornecedores de produtos de consumo duráveis ou não duráveis respondem solidariamente pelos vícios de qualidade”. Esta é uma situação extremamente incomoda para quem vem navegando sem parâmetros e instrumental adequados para o controle da sanidade dos alimentos, como as grandes redes supermercadistas que, atendendo às solicitações de seus clientes, vêm disponibilizando, cada vez mais, espaços para comercialização de produtos de conveniência, como os alimentos in “natura” e minimamente processados.

Os alimentos podem ser contaminados por agentes biológicos, químicos ou físicos, durante todo o seu processamento: armazenamento, preparação e distribuição para o consumo. Assim, é essencial o controle de condições higiênicas sanitárias em Unidades de Alimentação e Nutrição – UAN (ZACCARELLI et al, 2000).

Para garantir a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos são utilizados normalmente recursos como: aplicação do método de Análises de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC) e a realização de programas de educação continuada para manipuladores de alimentos (OMS,1987; REGO,1997). A APPCC aponta os perigos determinados pelas investigações epidemiológicas, diagnosticando agentes etiológicos de toxinfecções alimentares, aos quais os indivíduos estão expostos e institui um método de controle para evitar a contaminação dos alimentos (BRYAN, 1993). Os treinamentos para manipuladores devem abranger conhecimentos de higiene e controle sanitário das Unidades de

Alimentação e Nutrição (UANs), tais como: higiene pessoal, ambiental, de utensílios, de equipamentos e de alimentos, e serem realizados de forma contínua (SILVA Jr., 1996; ARRUDA et al., 1996).

A OMS (1994) reconhece a necessidade de abordagens inovadoras em educação na formação de manipuladores de alimentos, visto que mudança de práticas relacionadas a alimentos não ocorre apenas com informação objetiva.

A preferência do consumidor por refeições convenientes de aquisição e preparo rápido, expandiu o segmento de restaurantes e o comércio de produtos minimamente processados, sendo seus proprietários, leigos em sua maioria, não têm preocupação de implementar sistemas de controle que assegure um padrão de qualidade aos alimentos oferecidos. Como consequência, de acordo com Ungar; Germano e Germano (1992) apud Gonçalves (1998), a maioria dos casos de doenças de origem microbiana, transmitidas por alimentos, estão relacionadas ao mau acondicionamento dos mesmos, contaminação cruzada, deficiente higiene pessoal e de equipamentos, manipuladores infectados, entre outros.

As toxinfecções alimentares, enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados e/ou substâncias tóxicas, constituem um importante problema sanitário cujo dimensionamento é dificultado no Brasil devido a não obrigatoriedade de notificação dos surtos (OMS, 1984; EIROA, 1989). Em países desenvolvidos, entretanto, os registros demonstram que 60% dos surtos de toxinfecção alimentar são decorrentes do consumo de alimentos contaminados servidos em restaurantes, destacando entre os pratos um variedade de saladas cruas (JACOB, 1990 apud LIMA; MELO e SENA, 1998).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define doença transmitida por alimentos (D.T.A.) como “uma doença de natureza infecciosa ou tóxica causada por ou através do consumo de alimentos ou água contaminados”. Cabendo aos serviços de Vigilância Sanitária prevenir e minimizar os riscos de D.T. A., ocasionados por consumo de produtos alimentícios de má qualidade higiênico-sanitária.

Alimentos contaminados representam perdas econômicas para empresas, risco a saúde da população e segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (1984) mais de 60% das enfermidades de origem alimentar são provocadas por agentes microbiológicos, relacionados aos produtos alimentícios, principalmente considerando que o consumidor desempenha importante, e às vezes decisivo papel na manipulação e no preparo dos alimentos antes de serem servidos.

Atualmente, o conceito de segurança alimentar está sendo discutido também em função dos riscos causados pelos alimentos à saúde, uma vez que as doenças de origem alimentar vêm aumentando gradualmente em países em desenvolvimento (FAO, 1995). Portanto, pode-se dizer que a segurança alimentar é o acesso assegurado do indivíduo a alimentos inócuos, em quantidade necessária que satisfaçam as suas necessidades nutricionais considerando seus hábitos alimentares, de modo a garantir uma vida saudável. Pesquisas realizadas por Silva Jr. (1999); WINARDNI (2000), evidenciam a contaminação de alimentos como responsáveis por mais de 90% dos episódios de enfermidades transmitida por alimento (ETA), incluindo as salmoneloses, cólera, e demais doenças entéricas de origem bacteriana. Dentre os casos mais freqüentes de contaminação, Silva Jr. (2001) destaca aqueles provocados pela manipulação inadequada, má utilização da temperatura durante o preparo e conservação dos alimentos, higiene pessoal dos manipuladores, contaminação cruzada, deficiência na higienização dos equipamentos e utensílios e presença de pessoal infectado (assintomático ou não).

Um grande número de infecções entéricas pode ser causado pela ingestão de hortaliças cruas contaminadas principalmente por bactérias, vírus entéricos, helmintos e protozoários. A contaminação dessas hortaliças pode ocorrer devido à presença de fezes humanas e outros animais na água de irrigação, solo, bem como, através da manipulação, transporte inadequado, etc, sendo a principal fonte de contaminação das verduras no Brasil (OLIVEIRA e GERMANO, 1992,b).

A utilização de matéria fecal proveniente de criações domésticas como adubo oferece riscos, porque muitos parasitas de animais são igualmente patogênicos para o homem (OLIVEIRA; GERMANO e GERMANO, 1992).

A verificação da presença de enteroparasitas em verduras reveste-se de grande interesse para a Saúde Pública, pois fornece dados para Vigilância Sanitária sobre o estado higiênico destes produtos. As formas de transmissão de enteroparasitas constituem excelentes indicadores da contaminação fecal de verduras. Por esta razão, ressaltam-se a importância dos exames parasitológicos como instrumentos fundamentais para avaliação das condições higiênico-sanitárias dos alimentos de origem vegetal (OLIVEIRA; GERMANO, 1992, a).

Com o objetivo de garantir a qualidade dos alimentos vendidos no comércio e em restaurantes, deve-se primeiramente partir de uma ação educativa da população, sempre lembrando que esta ação deve seguir a realidade da região na

qual esta população está inserida. Esta atividade deve ser dirigida aos produtores e ao pessoal que trabalha nos estabelecimentos, dando destaque aos manipuladores dos alimentos. Através deste trabalho educativo é que podemos chegar a alimentos com condições higiênico-sanitária satisfatórias ao consumo humano (SIQUEIRA e MOURA, 1997).

Portanto, a contaminação ocorre em três fases da produção destas verduras, que seriam durante a sua produção, pelo solo e água contaminados; durante sua comercialização pelas mãos dos produtores e caixas de transporte; e finalmente no momento de sua manipulação para consumo, também através das mãos e superfícies de contato contaminadas e higienização insatisfatória das verduras (SIQUEIRA e MOURA, 1997).

A intoxicação alimentar ocorre após o consumo de alimentos contendo toxinas, que podem ser químicas (metais pesados) ou bacterianas, em origem. As bactérias multiplicam-se e produzem a toxina no alimento contaminado. Os organismos podem ser destruídos durante o preparo dos alimentos, mas a toxina não é afetada. O alimento pode servir de veículo para o patógeno ou favorecer seu desenvolvimento em quantidades suficientemente grandes capazes de causar doença. As infecções do trato gastrointestinal (gastroenterite, diarreia, disenteria, enterocolite) podem se associar aos microrganismos *Escherichia coli* EHEC e ETEC, *Salmonella* spp, *Bacillus cereus*, etc (MIMS, et al. 1999).

O parasitismo é uma relação direta e estreita entre dois organismos geralmente bem determinados: o hospedeiro e o parasita, que leva à produção de doenças parasitárias. As doenças parasitárias são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade em todo mundo, e freqüentemente estão presentes com sinais e sintomas não específicos (COSTA, et al., 2001).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmam que mais de 2 bilhões de pessoas hoje estão infectadas com algum tipo de verme ou parasita (DIAS, 2002). Atualmente estima-se que exista 3 milhões de pacientes com helmintíase no mundo e, segundo a OMS aproximadamente 800 a 950 milhões de indivíduos são portadores de *Ascaris*, 700 a 900 milhões estão infectados por *Ancilóstomo*, 500 milhões por *Trichures*, 200 milhões por *Giardia* e 500 milhões por *Entamoeba histolytica* (COSTA, et al., 2001).

Os maiores riscos de contaminação de verduras e legumes consumidos crus estão nas práticas de agricultura que envolve adubos de origem animal e

vegetal. A situação é mais séria nos países menos desenvolvidos, onde o uso de adubos naturais ou parcialmente tratados é comum e o risco é obviamente maior nos vegetais que crescem junto ao solo. Além de sua composição natural, o solo possui outros fatores que favorecem a sobrevivência de inúmeros microrganismos, tais como: umidade, temperatura e pH (LIMA, 2006).

No Brasil, as parasitoses intestinais ainda constituem um sério problema de saúde pública, apresentando maior prevalência em população de nível sócio econômico mais baixo e condições precárias de saneamento básico, resultado em altos índices de morbidade. Em crianças, principalmente com idades entre 0 e 5 anos, por apresentarem, normalmente, hábitos higiênicos mais precários, ou a ausência de imunidade de re-infecções, o parasitismo intestinal torna-se mais freqüente e relevante, inclusive pela possibilidade de redução de absorção intestinal, podendo influenciar no crescimento e desenvolvimento (UCHOA et al., 2001), podendo levar à diminuição da imunidade, anemia, subnutrição, desnutrição e até à morte (DIAS, 2002).

A Organização Mundial da Saúde – OMS (1989) estabelece um limite para ovos de nematóides em águas para irrigação, sem restrições quanto ao vegetal menor ou igual a 1 ovo/litro. Isto parece ser suficiente para proteger os consumidores de hortaliças cultivadas com irrigação por aspersão, usando efluentes de qualidade consistente e em climas quentes (BLUMENTHAL *et al.*, 2004).

Esses parasitas podem ser veiculados as alfaces através do clima chuvoso, que podem arrastar ovos de helmintos, ou cistos de protozoários até as hortaliças, sendo que na ausência de chuvas há maior necessidade de irrigação dos vegetais. A água de irrigação também é contaminada quando os parasitas são levados pelas chuvas ate os rios (BLUMENTHAL *et al.*, 2004).

3.2 SISTEMA DE CULTIVO TRADICIONAL NO SOLO E ORGÂNICO

O Brasil, país de dimensões continentais, apresenta cerca de 20% do solo agriculturável do mundo e demais condições que tornam um dos principais produtores de alimentos do planeta. A responsabilidade no manejo dessa reserva é muito grande, pois se trata de um recurso estratégico, não renovável, de alta importância social, econômica e ambiental (ARBOS, 2009).

Ao longo do processo de modernização da agricultura no Brasil, muitos problemas ambientais e de saúde surgiram em decorrência da intensa mecanização e o uso indiscriminado de agrotóxicos. A difusão dos aspectos negativos da agricultura tradicional, tais como esgotamento dos recursos naturais, degradação ambiental e os riscos de sobrevivência do planeta às gerações futuras, reforça a necessidade da construção de um novo paradigma de desenvolvimento, no qual o crescimento econômico e a garantia de condições dignas de vida à população passassem a ser enfocados nos limites da sustentabilidade do meio ambiente (ARBOS, 2009).

Em culturas convencionais os vegetais crescem no solo com aporte adequado de nutrientes e água. Para uma melhor produção fertilizante são frequentemente utilizados (GUADAGNIN et al., 2005).

A agricultura orgânica é definida como sendo a produção de alimentos de origem vegetal ou animal, sem a utilização de agrotóxicos e adubos minerais sintéticos ou outros agentes contaminantes, visando à maximização dos benefícios sociais, a auto-sustentação, a redução ou eliminação da dependência de insumos sintéticos, energia não renovável e a preservação do meio ambiente, por meio da otimização do uso de recursos naturais e sócio-econômicos disponíveis (HAMERSCHIMIDT, 1998). Basicamente, a agricultura orgânica tem como sustentáculo a aplicação no solo de resíduos orgânicos vegetais e animais, de preferência produzidos na propriedade agrícola, com o objetivo de manter o equilíbrio biológico e a ciclagem de nutrientes (FEIDEN, 2001).

Muito atraente em termos financeiros, o mercado de produtos orgânicos se depara com uma das mais importantes dificuldades para a sua expansão: a conversão dos sistemas convencionais para sistemas orgânicos. As áreas de lavoura convencional, cujas pragas e doenças são controladas à base de

defensivos, fazem com que os primeiros anos de agricultura orgânica possam representar dificuldades de produção para o produtor (ASSIS; AREZZO e DE-POLLI, 1995; ASSIS et al., 1996).

O binômio saúde/alimentação vem despertando a atenção do consumidor na busca por alimentos mais saudáveis. Não é, portanto, surpreendente que a agricultura orgânica apresente-se em ampla expansão em nível mundial por suas características de sustentabilidade e oferta de produtos de qualidade, com certificação de origem, que atendem à crescente demanda por parte de consumidores mais exigentes (ALMEIDA et al., 2000). Para as culturas folhosas, problemas sérios podem acontecer no cultivo convencional, pois o uso de altas doses de adubos solúveis, principalmente o nitrogênio, aliado à intensa aplicação de agrotóxicos, pode levar a produção de alimentos de qualidade contestada, como já observado na cultura da alface (MIYAZAWA; KHATOUNIAN e ODENATH-PENHA, 2001) e a um alto custo de produção (RODRIGUES, 1990).

De acordo com Darolt (2003), há evidências da superioridade nutricional e menor risco toxicológico dos produtos orgânicos. Porém, segundo o autor, esse é ainda um campo pouco explorado pela pesquisa científica. Nesse sentido, resultados positivos foram observados por Rodrigues (1990) que utilizando adubação orgânica no cultivo de alface, observou ganho de produtividade e aumento dos níveis de nutrientes na planta.

Sob ponto de vista econômico, Engindeniz e Tuzel (2006) cultivando alface orgânica em casa de vegetação na Turquia, concluíram que esse sistema de plantio é bastante promissor economicamente, em função da alta qualidade do produto que pode ser obtida, sendo, portanto, uma boa alternativa para pequenos agricultores.

Os principais fatores de estresse das culturas agrícolas são a temperatura do ar, a disponibilidade de água e os nutrientes. O efeito do estresse sobre a planta se caracteriza pela redução da fotossíntese e do crescimento, alterações no padrão de repartição da massa seca entre órgãos e modificações no balanço hormonal. Com relação à cultura da alface, o excesso de umidade no solo pode provocar redução na altura da planta, no diâmetro e no peso da parte aérea, além da redução no diâmetro do caule, sendo a variável massa fresca da parte aérea aquela que apresenta maior sensibilidade. De acordo com o mesmo autor, em seu estudo não foi identificada à fase da cultura que apresentou maior sensibilidade a esse fenômeno (ANDRIOLO; ESPINDOLA e STEFANELLO, 2003).

3.3 SISTEMA DE CULTIVO HIDROPÔNICO

A hidroponia (hydro = água e ponos = trabalho) é a ciência de cultivar plantas sem solo, onde as raízes recebem uma solução nutritiva balanceada contendo água e todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta. Apesar de ser uma técnica relativamente antiga, o termo hidroponia só foi utilizado pela primeira vez em 1935 pelo americano Dr. W. F. Gericke, da Universidade da Califórnia. Entretanto, somente na década de 60, com os trabalhos do inglês Allen Cooper, o qual criou a primeira versão do sistema NFT (*Nutrient Film Technique*), percebeu-se que a hidroponia seria uma ótima opção de cultivo em escala comercial. No final da década de 80 a técnica foi mundialmente consolidada, inclusive no Brasil, onde, nos últimos anos, tem sido comum encontrar produtos hidropônicos em supermercados de grandes centros consumidores, sendo o estado de São Paulo o maior produtor (TEIXEIRA-YAÑEZ 2000; LABHIDRO 2006). Dentre os fatores que contribuíram para uma significativa expansão da hidroponia encontram-se: a produção de hortaliças de ótima qualidade; melhor ergonomia pelo uso de bancadas; melhor aproveitamento de espaço físico, por permitir cultivos sucessivos; a menor incidência de pragas e doenças e, portanto, menor aplicação de tratamentos fitossanitários; maior tempo de prateleira para a comercialização do produto; o melhor controle do meio nutritivo para o crescimento das plantas e o aproveitamento de água e nutrientes (FURLANI 1996; RODRIGUES, 2002; HIDROGOOD, 2007).

No Brasil, o cultivo hidropônico comercial, no sistema de fluxo laminar de nutrientes, NFT, tem sido encontrado, principalmente, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. A alface é a espécie de maior expressão no sistema de cultivo sem solo, possivelmente por ser a hortaliça folhosa de maior aceitação pelos consumidores, apresentar ciclo curto, alta produtividade e rápido retorno do capital investido (SANTOS, 2000; LONDERO e AITA, 2000). A solução nutritiva é fundamental ao desenvolvimento das plantas. Se manejada de forma incorreta provoca redução na produtividade e na qualidade do produto. Dessa forma, vários cultivos hidropônicos realizados no país são legados ao fracasso em função do desconhecimento do manejo nutricional (FURLANI et al., 1999).

A solução nutritiva é composta de macro e micro-nutrientes, sendo os macronutrientes, o nitrogênio (N), o fósforo (P), o potássio (K), o cálcio (Ca), o

magnésio (Mg), e o enxofre (S) e, os micronutrientes, o boro (B), o cloro (Cl), o cobre (Cu), o ferro (Fe), o manganês (Mn), o molibdênio (Mo) e o zinco (Zn) (FURLANI *et al.* 1999; HIDROGOOD, 2007).

Não existe uma solução nutritiva que seja única e melhor que todas as demais para o cultivo de determinada espécie vegetal, pois estão envolvidas diversas variáveis e suas interações. Assim, o preparo e a manutenção de uma solução nutritiva dependem da espécie vegetal, cultivar, estágio fenológico, variáveis ambientais, época do ano (fotoperíodo) e tipo de sistema hidropônico (cultivo em substrato ou em água, sistema sem ou com recirculação de solução nutritiva) (NETO e ZOLNIER, 2010).

O preparo e manejo das soluções nutritivas empregadas nos cultivos hidropônicos requerem muito tempo e mão-de-obra, pois exige controle de temperatura, oxigenação d'água, pH e condutividade elétrica da solução. Portanto, segundo Neto e Zolnier (2010), pode-se dispor de aparelhos que realizam estes procedimentos conforme as orientações programadas, reduzindo o custo e melhor aproveitando os recursos para produção.

Atualmente existem diversas fórmulas recomendadas para o cultivo da alface. No entanto são poucas as informações sobre qual seja a melhor solução, pois elas apresentam grande diferença nas concentrações de nutrientes. Além disso, fatores como idade das plantas, época do ano e condições climáticas locais influenciam a eficiência da solução nutritiva (FAQUIN; FURTINI e VILELA, 1996).

Para o cultivo hidropônico, têm sido encontradas boas alternativas comerciais, mesmo em mercados tradicionais, como as CEASAS. Com isso, enfatizou-se a qualidade associada à mercadoria. A alface cultivada em hidroponia, principal produto dessa linha, consegue preços superiores, mesmo quando comercializada na CEAGESP em engradados comuns. Seu preço fica entre 35 e 50% acima dos alcançados pelas cultivadas em sistemas tradicionais (JUNQUEIRA, 1999).

No Brasil, as principais culturas produzidas sob hidroponia são a alface (*Lactuca sativa* L.), a abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), o aipo (*Apium graveolens* L.), o agrião (*Lepidium sativum* L.), a cebolinha (*Allium fistulosum* L.), o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), a menta (*Mentha piperita* L.), o morango (*Fragaria* spp.), o pepino (*Cucumis sativus* L.), o pimentão (*Capsicum cordiforme* Mill.), a rúcula (*Eruca sativa* L.), a salsa (*Petroselinum* spp.), o tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Miller), entretanto, a alface perfaz a preferência de 90% dos hidroponicultores, pois

apresenta ciclo de vida curto, alta produtividade e ampla aceitação no mercado (FURLANI, 1999; HIDROGOOD, 2007).

3.4 Água

As águas em todo o planeta cobrem três quartos da superfície da Terra, no entanto, mais de 97% é salgada e menos de 3% é água doce. Desta última, 77% apresentam-se congelados nos círculos polares, 22% compõem-se de águas subterrâneas e a pequena fração restante encontra-se nos lagos, rios, plantas e animais (WORLD RESOURCE INSTITUTE AND INTERNATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT, 1988). Constituem-se em um recurso natural finito que, com a escassez futura, poderá limitar o crescimento da agropecuária e da indústria, colocando em risco a saúde, nutrição e desenvolvimento econômico.

Desta forma, o universo aquífero deve ser preservado em quantidade e qualidade para que o desenvolvimento e o progresso da sociedade mundial não sejam comprometidos. Tal preservação inclui várias medidas, como: conservação de nascentes e mananciais de abastecimento, bem como dos lençóis subterrâneos; conscientização e educação das sociedades, visando ao uso racional das águas; estabelecimento de parâmetros para um desenvolvimento sustentável dos recursos hídricos; colheita de esgotos urbanos, industriais e rurais, com posterior tratamento, dentre outras (SCANDOLERA, et al. 2001).

Nos países em desenvolvimento as doenças diarréicas de veiculação hídrica são responsáveis por vários surtos epidêmicos e pelas elevadas taxas de mortalidade infantil. Temos como exemplos dessas enfermidades: febre tifóide, cólera, salmonelose, shigelose, poliomielite, hepatite A, verminoses, amebíase e giardíase. Estas doenças são causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal, ou humana, transmitidos basicamente pela rota fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água poluída com fezes (GRABOW, 1996).

A detecção de Coliformes totais em amostras de águas não é necessariamente um indicativo de contaminação fecal, pois o grupo designado como coliformes totais engloba um grande número de bactérias, entre elas a *Escherichia coli*, exclusivamente de origem fecal e que dificilmente multiplica-se fora do trato intestinal, no entanto engloba também outras bactérias dos gêneros *Citrobacter*, *Eiterobacter* e *Klebsiella*, igualmente identificadas pelas técnicas laboratoriais como coliformes totais e que são comumente encontradas no solo e nos vegetais (SOUZA e PERRONE, 2000).

3.5 MICRORGANISMOS ANALISADOS

3.5.1 Coliformes totais

Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C, por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O habitat dos coliformes é o trato intestinal do homem e de outros animais. Outras enterobactérias podem ser encontradas no meio ambiente ou até em água potável. Fazem parte deste grupo bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, além de serem encontrados nas fezes, também podem estar presentes em outros ambientes como solo e vegetais, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas enquanto que índice de coliformes fecais é usado para avaliar a qualidade higiênico-sanitária. Coliformes são geralmente usados também com indicadores de deficiência de saneamento (VIEIRA e OLIVEIRA, 2001)

O grupo coliforme é indicador da contaminação de origem fecal, podendo ser pesquisado por meio da técnica de tubos múltiplos que expressa uma estimativa

estatística do número de microrganismos presentes na amostra, conhecida como Número Mais Provável (MACHADO et al., 2001). O número mais provável de coliformes totais e fecais indica a contaminação de origem ambiental e fecal e indiretamente informa sobre a provável presença de outros patógenos entéricos (LIRA et al., 2001).

3.5.2 Coliformes Termotolerantes

Coliformes termotolerantes são bactérias que se apresentam na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aneróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5° - 45,5°C. O grupo de coliformes fecais abrange pelo menos três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal. (SILVA; JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2001).

Embora sendo um habitante normal e inofensivo do intestino de homens e animais, algumas cepas são patogênicas em crianças, adultos e animais quando presentes em outras partes do corpo humano, como o trato urinário ou meninges aonde elas podem causar doenças, assim como intoxicações alimentares (HOBBS e ROBERTS, 1999).

Escherichia coli é o mais versátil de todos os patógenos bacterianos. Algumas cepas são membros importantes da microbiota intestinal normal no homem e animais, enquanto que outras possuem fatores de virulência importantes na infecciosidade do trato gastrointestinal e outras regiões do organismo, particularmente o trato urinário. As cepas causadoras de diarreia apresentam vários mecanismos patogênicos distintos e diferem em epidemiologia, exemplo: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora de verotoxina (EHEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (MIMS, et al. 1999).

Almeida (2006) e Palú et al. (2002) analisaram hortaliças frescas e saladas cruas em restaurantes do padrão *self-service* e constataram a presença de coliformes termotolerantes em níveis insatisfatórios quando comparados à legislação vigente.

3.5.3 *Salmonella* ssp

Salmonelas são bactérias na forma de bacilos Gram-negativos, não esporulados. Pertence à família Enterobacteriaceae, embora as salmonelas clinicamente mais importantes não fermentam lactose, sendo referência para isolamento no meio de cultura. Algumas cepas podem receber plasmídios que transportam genes que codificam enzimas permitindo que a *Salmonella* apresente colônias lactose positiva semelhante à *Escherichia coli*. A transmissão da *Salmonella* spp para o homem geralmente ocorre pelo consumo de alimentos contaminados. Os produtos alimentícios de origem animal, como carne, leite e ovos, consistem os veículos mais comumente para o homem (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Entretanto as mesmas propriedades que o tornam um alimento importante, favorecem o crescimento de microrganismos, tanto saprófitas deterioradores como patogênicos potenciais, a exemplo das bactérias do gênero *Salmonella*. Os primeiros, além de promoverem prejuízos econômicos às indústrias, utilizando a matéria-prima, reduzem a qualidade de seus derivados, enquanto que os últimos põem em risco a saúde do consumidor (MARTH, 1969).

O gênero *Salmonella* inclui duas espécies: *Salmonella entérica* subdividida em seis subespécies e *Salmonella bongori* sendo no total, mais de 2324 sorotipos. Este gênero pertence a família das enterobacteriaceae e as principais fontes de infecção são fezes humanas e de animais (TESSARI et al., 2003). A *Salmonella* spp é uma bactéria que ocorre principalmente em aves e suínos acometendo também ser humano e outros animais. As vias de transmissão incluem a água, solo, insetos, fômites, equipamentos, utensílios utilizados na preparação de alimentos, fezes de animais, carnes cruas de bovino, frango e pescado. Apesar de ser primariamente uma bactéria intestinal, ela pode ser encontrada em efluentes de propriedades rurais, esgoto humano e produtos submetidos a contaminação fecal (TESSARI et al., 2003).

A taxonomia do gênero *salmonella* é baseada na composição de seus antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (VI). O antígeno O localiza-se na fração lipopolissacarídica (LPS) da membrana externa. Essa fração é constituída de um lipídeo, denominado lipídio A,

responsável pelo efeito tóxico (endotoxina). Os antígenos H são de natureza protéica. Os antígenos O e VI são termorresistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100°C por 2 horas e os antígenos H são termolábeis (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

As salmonelas multiplicam-se em temperaturas entre 7°C e 49,5°C, sendo 37°C a temperatura ótima para desenvolvimento, na qual em 4 horas, o alimento contaminado pode transformar-se em alimento infectante. Abaixo de 7°C, para a maioria dos sorotipos, não há multiplicação (GERMANO e GERMANO, 2003).

Seres humanos podem disseminar salmonelas para outros seres humanos. Portadores assintomáticos e pessoas doentes, que excretam salmonelas nas fezes, põem contaminar suas mãos. Se pessoas com as mãos contaminadas estiverem envolvidas na preparação de alimentos, elas podem inocular a *Salmonella* spp. Se o alimento for estocado em local não refrigerado por algumas horas, a bactéria pode multiplicar-se, alcançando número suficiente para causar doença naqueles que ingerirem (PELCZAR; CHAN e KRIEG, 1997).

Na maioria dos casos, *Salmonella* spp Causa uma diarreia aguda porem autolimitada, mas em indivíduos jovens e idosos os sintomas podem ser severos e levar a óbito (MIMS et al. 1999).

Palú et al. (2002), avaliando amostras de hortaliças frescas em restaurantes *self-service*, encontraram *Salmonella* spp em saladas de alface. Almeida (2006), não encontrou *Salmonella* spp nas saladas de alface analisadas também em restaurantes do padrão *self-service*.

3.5.4 *Staphylococcus coagulase positiva*

As bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Microcaceae* e por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cacho de uva. São facultativas anaeróbias, com maior crescimento sob condições eróbias, quando então, produzem catalase (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

As cepas de *Staphylococcus aureus* produzem cinco enterotoxinas sorologicamente distintas (A, B, C, D, E), todas elas resistentes ao calor e à ação das enzimas no estômago e intestino delgado. O mecanismo de ação destas toxinas não está bem compreendido, mas possuem um efeito no sistema nervoso central que resulta em vômito, dentro de 3-6 horas após o consumo do alimento. Pode dar diarreia com recuperação em até 24 horas. O aquecimento subsequente pode matar as bactérias mas a toxina é estável podendo ser detectada por aglutinação em látex (MIMS, et al. 1999).

Os estafilococos são bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C; as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, com ótimo entre 40°C e 45°C. Os surtos de intoxicação alimentar esta relacionado ao alimento que sofre esta variação de temperatura, portanto quanto mais baixa for a temperatura, maior o tempo necessário para a produção de enterotoxina. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente entre quatro e seis horas. Estas bactérias são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas. Em relação ao pH, crescem na faixa de 4 a 9,8 com o ótimo entre 6 e 7 (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O período de incubação médio da doença é de duas a quatro horas (de 30 minutos a 8 horas). O início dos sintomas é, geralmente, rápido e de natureza aguda, variando com o grau de suscetibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento, quantidade consumida do alimento e o estado pregresso do paciente (GERMANO e GERMANO, 2003).

Durante anos a bactéria *S. aureus* foi considerada a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxina, bem como de produzir coagulase, até que outras espécies produtoras de coagulase, tais como *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram identificadas e, inclusive, surtos de intoxicação foram atribuídos a estas duas espécies (SILVA e GANGRA, 2004).

Compatibilizando a legislação brasileira a estes fatores, e devido a grande semelhança fenotípica entre as três espécies de *Staphylococcus*, foram estipulados limites para presença de estafilococos coagulase positiva em alimentos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001), enquanto que anterior, Portaria 451, de 19 de setembro de 1997, estipulava parâmetros para contagens de *S. aureus*.

Os sintomas aparecem 1 a 6 horas após o consumo do alimento contaminado e incluem náusea intensa, vômito e diarreia moderada, normalmente sem febre. Os sintomas desaparecem em menos de 12 horas e, embora sejam muito desagradáveis, a doença raramente é fatal (PELCZAR, et al. 1997).

Palú et al. (2002), detectaram duas cepas de *Staphylococcus* produtoras de enterotoxinas, isoladas de salada de alface, em estudo de avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas em restaurantes *Self-service*.

3.5.5 Aeróbios mesófilos

Os microrganismos aeróbios mesófilos em contagem elevada nos alimentos perecíveis são indicativos do uso de matéria-prima contaminada ou processamento insatisfatório, sob o ponto de vista sanitário. Em relação aos alimentos perecíveis, pode indicar abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura. A deterioração de alimentos pode ser casada por números elevados, considerando-se que alterações nos alimentos são detectáveis em contagens superiores a 10^6 UFC/g do alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Contagem elevada de mesófilos, que crescem à mesma temperatura da do corpo humano, significa que houve condições para que esses patógenos se multiplicassem já que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas (FRANCO e LANDGRF, 2005).

3.5.6 Bolores e leveduras

Os fungos são seres vivos eucarióticos com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (fungos macroscópicos). Apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não tem celulose na parede celular, exceto alguns fungos

aquáticos, e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham as células animais (PELCZAR, et al. 1997).

Os fungos são ubíquos, encontram-se em vegetais, em animais, no homem, em detritos e em abundância no solo, participando do ciclo dos elementos da natureza. A sua dispersão é feita por várias vias: animais, homem, inseto, água e principalmente, pelo ar atmosférico, através dos ventos (PELCZAR, et al. 1997).

Quando se desenvolvem em meios especiais de cultivo formam colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriforme, em geral, são pastosas ou cremosas e caracterizam o grupo das leveduras. São unicelulares e suas estruturas mais comuns são os blastosporângios, também denominados gêmulas, que possuem forma em geral arredondada ou ovalada. Por brotamento da célula – mãe, forma –se os brotos ou as células-filha, que podem desprender-se, ou permanecer ligado a célula-mãe, em cadeia, formando pseudo-hifa, cujo conjunto é pseudomicélio. As colônias filamentosas que identificam os bolores podem ser algodonosas, aveludadas, pulverulentas, com os mais variados tipos de pigmentação. Esses organismos são constituídos fundamentalmente por elementos multicelulares, em forma de tubos – as hifas – que podem ser contínuas, não-septadas ou cenocíticas e septadas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Em alimentos de baixa acidez e alta atividade de água o crescimento de bolores e leveduras é mais lento do que o de bactérias. Portanto dificilmente serão responsáveis pela deterioração desses alimentos. Em alimentos ácidos e de baixa atividade de água, o crescimento de fungos é maior, provocando deterioração com grande prejuízo econômico em frutas frescas, vegetais, cereais, sucos de frutas, queijos e em conservas armazenadas em condições inadequadas (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A presença desses microrganismos pode tornar-se um perigo à saúde pública devido à produção de micotoxinas pelos bolores. Já as leveduras ocasionam deterioração, mas não são prejudiciais à saúde. Baixas contagens de bolores e leveduras são normais em alimentos frescos e congelados, não sendo, portanto, significativas. Somente quando o crescimento de bolor for visível ou o alimento apresentar um número elevado de leveduras, o consumidor será capaz de reconhecer a deterioração (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

As alfaces (*Lactuca sativa*) foram coletadas em seu local de cultivo, tanto pelo método de hidroponia (hortas C e D) como pelo tradicional no solo (hortas A e B), juntamente com a amostra da água utilizada em seu manejo. Estes estabelecimentos hortifrutigranjeiros se localizam no noroeste paulista.

Foram coletadas amostras de alface em restaurante tipo *self-service* fornecidas regularmente pela Horta D de cultivo hidropônico.

Coletou-se 25 amostras de alface, sendo 10 de cultivo pelo método de hidroponia e 10 pelo método tradicional no solo e 5 do restaurante. Foram coletadas 20 amostras de água utilizada no manejo das hortas. A coleta foi realizada em diferentes dias.

No procedimento de coleta da alface, foram utilizados sacos plásticos apropriados contendo as informações do local de coleta, horário, data, tipo de sistema de cultivo utilizado. O transporte ocorreu em uma caixa térmica evitando o atrito e possíveis danos, sob processo de refrigeração (gelo reciclável) não deixando que ultrapassasse os 8°C. Do local de coleta ao início das análises durou em média três horas.

As amostras coletadas foram transportadas ao Laboratório Escola de Análises Clínicas da Fundação Educacional de Fernandópolis, onde foram analisadas, contando com apoio do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - IBILCE - UNESP - São José do Rio Preto - SP.

4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas as análises microbiológicas para estimativa do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45 °C e para presença/ausência de *Salmonella* spp, bactérias para as quais existem padrões estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2001) e também para *Staphylococcus* coagulase positiva, aeróbios mesófilos, coliformes totais, bolores e leveduras e parasitológico para uma melhor avaliação das condições higiênico-sanitárias das amostras.

Para as análises microbiológicas foram utilizadas as metodologias tradicionais descritas por Silva; Junqueira e Silveira (2001), de acordo com a American Public Health Association, descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992).

Na análise parasitológica foi utilizado o Método de Hoffman, Pons e Janer ou Lutz (Sedimentação Espontânea), descrita por NEVES et al. (2005). A metodologia foi adaptada para análise da água e alface.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

As preparações das amostras para as análises envolvem basicamente duas etapas: a retirada da unidade analítica, que deve ser feita de forma a garantir que a porção removida seja representativo de todo conteúdo da unidade e a preparação de diluições decimais seriadas da unidade analítica, para inoculação nos meios de cultura. No caso de alimentos sólidos ou líquidos concentrados, a primeira diluição (10^{-1}) deve ser acompanhada de uma adequada homogeneização da unidade analítica, que pode ser conseguida por agitação, trituração em liquidificador ou dispersão em “stomacher” (SILVA; JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2001).

Na câmara de fluxo laminar foi realizada a assepsia da área externa das embalagens com etanol 70°_{GL}, para remover os contaminantes presentes.

Cada amostra foi dividida em dois sacos plásticos estéreis tarados e pesados.

Para as análises de coliformes totais e termotolerantes, aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva, bolores e leveduras foram feitas as diluições das amostras, adicionando o volume de diluente água peptonada 0,1% para diluição inicial desejada, de 1:1, ou seja, 1,0 mL de diluente por grama de amostra, de forma que cada mililitro do lavado correspondesse a um grama de amostra. Cada amostra foi lavada agitando vigorosamente o saco, por 50 vezes, massageando a hortaliça com as mãos, por fora do saco, tomando os devidos cuidados para que pontas ou outras protuberâncias não furassem a embalagem.

Da diluição inicial foram retirados 25 mL, adicionando em um frasco estéril com 225mL de água peptonada 0,1%, homogeneizando em seguida, obtendo assim uma diluída a 10^{-1} , em seguida realizou-se diluições seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} onde foi transferido assepticamente uma porção a cada meio utilizado nas análises descritas no item 4.4.

Para as análises de *Salmonella* spp, foram feitas as diluições das amostras, adicionando o volume de diluente solução aquosa de Verde Brilhante 0,14% para diluição inicial desejada, de 1:1, ou seja, 1,0 mL de diluente por grama de amostra, de forma que cada mililitro do lavado correspondesse a um grama de amostra. Cada amostra foi lavada agitando vigorosamente o saco, por 50 vezes, massageando a hortaliça com as mãos, por fora do saco.

Da diluição inicial para análise de *Salmonella* spp foi realizado um pré-enriquecimento, retirando 25mL e adicionando a um frasco estéril com 225mL de solução aquosa de Verde Brilhante 0,14%, homogeneizando e incubando a 35°C por 18 horas.

Na análise microbiológica da água para coliformes totais e termotolerantes foram transferidas 5 porções de 10,0mL da amostra para tubos com 10mL de caldo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) em concentração dupla, conforme a metodologia do AMERICAN PUBLIC HEALTH OF WATER AND WASTEWATER (1985) , descrita por Silva; Junqueira e Silveira (2001). Nas análises de aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras, foi conforme descrito para alface, indo da água pura à etapa de diluição inicial e seguindo com a diluição seriada até 10^{-3} .

Os resultados obtidos na análise da água foram comparados de acordo com a Portaria MS nº 518/2004, que tem como padrão ausência de coliformes totais e termotolerantes e contagem de bactérias heterotróficas até 500 UFC/mL. Amostras

obtidas de poços, nascentes, ou outras formas de abastecimentos sem distribuição canalizada, são toleráveis a presença de coliformes totais, na ausência de coliformes termotolerantes, desde que investigada a fonte de contaminação e repetindo-se as análises.

Nas análises parasitológicas as amostras de alface foram às mesmas utilizadas nas diluições iniciais com a solução de água peptonada 0,1%, já as da água foram realizadas diretamente da amostra.

4.4 METODOLOGIA DOS MICRORGANISMOS ANALISADOS

4.4.1 Contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos

Para contagem total dos aeróbios mesófilos nas amostras de alface foram selecionadas as diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e para análise da água 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , adicionando 1 mL de cada diluição do material, no fundo de uma série de placas de Petri estéreis, identificadas (código da amostra, microrganismo pesquisado, diluição, data e horário) e em seguida foram vertidos, em cada placa, 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) fundido e resfriado a 45°C, de acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001). As placas inoculadas ainda dentro da Câmara de Fluxo Laminar foram homogeneizadas com movimentos suaves na forma de oito misturando o inóculo. Aguardou-se a completa solidificação do meio, invertendo as placas e incubando a série a 35°C por 48 h, para a contagem de Unidade Formadora de Colônias - UFC. Após a incubação foram selecionadas, da série, as placas contendo entre 25 e 250 colônias. Realizou-se a contagem do respectivo número de colônias com auxílio do contador de colônias, multiplicando o número de colônias pela recíproca da diluição correspondente, obtendo a UFC por grama de alface ou mililitro de água.

O método utilizado foi por plaqueamento em profundidade.

Os resultados obtidos das amostras de alface foram comparados com os padrões estabelecidos para o estudo até 10^6 UFC/g.

4.4.2 Contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras.

Para contagem total dos aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras nas amostras de alface foram selecionadas as diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e para análise da água 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , adicionando 0,1 mL de cada diluição do material a ser examinado na superfície de duas séries de placas de Petri previamente preparadas, uma com Agar Padrão de Contagem (PCA) e outra com Agar Batata Dextrose (PDA) acidificado para contagem de bolores e leveduras, identificadas. As diluições foram espalhadas com auxílio da alça de Drigalski por toda a superfície do meio, até que todo excesso de líquido fosse absorvido, de acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001). As placas inoculadas e secas foram invertidas e incubadas. A pesquisa de bolores e leveduras foi feita a 25°C por 5 dias efetuando leitura prévia no terceiro dia e para contagem de bactérias psicrotróficas a 07°C por 10 dias. Decorrido o período de incubação selecionou-se, das séries, as placas contendo entre 25 e 250 colônias para aeróbios psicrotróficos e 10 a 150 colônias para bolores e leveduras, sendo então realizada a contagem do respectivo número de colônias com auxílio de um contador de colônias, multiplicando o número de colônias por 10 em seguida pela recíproca da diluição, obtendo o número de UFC de aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras por grama de alface ou mililitro de água.

Os resultados obtidos das amostras de alface foram comparados com os padrões estabelecidos para o estudo até 10^6 UFC/g.

4.4.3 Contagem direta em placas de *Staphylococcus coagulase positiva*

O objetivo da contagem de *S. aureus* tem duas dimensões diferentes, uma relacionada com a saúde pública, para confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, e outro com o controle da qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, servindo como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanificação das superfícies destinadas ao contato com alimentos (SILVA; JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2001).

Para contagem de colônias presuntivas de *Staphylococcus* coagulase positiva das amostras de alface foram selecionadas as diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e transferidas alíquotas de 0,3 mL + 0,3mL + 0,3mL + 0,1mL totalizando 1ml da diluição a 10^{-1} e alíquotas de 0,1mL das diluições 10^{-3} e 10^{-5} , na superfície de uma série de placas de Petri previamente preparadas com Agar Baird Parker (BP), identificadas. As diluições foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski por toda a superfície do meio, até que todo excesso de líquido fosse absorvido, de acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001). As placas inoculadas e secas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24-48 horas. Decorrido o período de incubação, selecionou-se, das séries, as placas contendo entre 20 e 200 colônias. Realizou-se a contagem do respectivo número de colônias típicas de *S. aureus* (colônias circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente) e atípicas (podem apresentar-se cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos), com auxílio de um contador de colônias.

As colônias suspeitas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) em seguida do BHI para um tubo contendo Ágar PCA inclinado e incubados a 35°C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação realizou-se: coloração de GRAM considerando positivas as que apresentaram cocos roxos com arranjo em forma de cacho de uvas, prova da catalase positiva (H_2O_2 a 3% + colônia despreendendo gás em forma de borbulhas) e coagulase transferindo 0,4mL do inóculo de BHI ao tubo de ensaio estéril, adicionando 0,1mL de Coaguloplasma (plasma de coelho) com EDTA, incubando a 37 °C e observando de 4 a 24 horas a formação de um coágulo. Reações de nível 3 ou 4 foram consideradas confirmativas para presença de *S. aureus*.

Após a confirmação das colônias os cálculos realizados foram: Exemplo 1: diluição 10^{-2} , 30 colônias típicas, 5 submetidas à confirmação, 3 confirmadas (60%). $UFC/g = 30 \times 10^2 \times 10 \times 0,6 = 1,8 \times 10^4$. Exemplo 2: diluição 10^{-2} , 30 colônias suspeitas (20 típicas e 10 atípicas), 10 submetidas à confirmação (5 típicas e 5 atípicas), 7 confirmadas (5 típicas=100% e 2 atípicas=40%). $UFC/g = (20 \times 10^{-2} \times 10 \times 1,0) + (10 \times 10^{-2} \times 10 \times 0,4) = 2,4 \times 10^4$.

Os resultados obtidos das amostras de alface foram comparados com os padrões estabelecidos para o estudo até 5×10^3 UFC/g o mesmo estabelecido a sanduíches frios e similares, já que não existem padrões destes para alface.

4.4.4 Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes

Foi determinada através do Número Mais Prováveis, utilizando um método clássico de fermentação da lactose, por meio da técnica dos tubos múltiplos de acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001), que permite a recuperação de células injuriadas pelo enriquecimento. Esta técnica se divide em teste presuntivo, teste confirmativo para coliformes totais, teste confirmativo para coliformes termotolerantes e teste confirmativo *E. coli* método tradicional.

4.4.4.1 Teste presuntivo

Selecionou-se uma série de três tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos e Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), identificados (diluições, código da amostra, data e hora), adicionou-se 1,0 mL da diluição correspondente por tubo de ensaio. As três séries de tubos foram incubadas a 35°C por 48 horas, foi efetuada uma leitura prévia com 24 horas e os tubos positivos (com crescimento e produção de gás) passaram as provas subseqüentes. Após as 48 horas de incubação, os tubos de ensaio sem alterações e sem produção de gás foram considerados negativos.

4.4.4.2 Teste confirmativo para coliformes totais

De cada tubo de ensaio positivo no teste presuntivo foi transferida uma parte do inóculo com auxílio da alça bacteriológica de 10µL para tubos de ensaios contendo tubo de Durham invertido e Caldo Verde Brilhante Bile (VB), identificados. Os tubos de VB foram incubados a 35°C por 48 horas, efetuando uma leitura prévia com 24 horas e anotados os tubos positivos (com crescimento e produção de gás), devido à fermentação da lactose. Após as 48 horas de incubação, os tubos de

ensaio sem alterações e sem produção de gás foram considerados negativos. Os tubos positivos foram utilizados na determinação do Número Mais Provável (NMP)/g ou mililitro apropriada às diluições inoculadas.

4.4.4.3 Teste confirmativo para coliformes termotolerantes

De cada tubo de ensaio positivo no teste presuntivo foi transferida uma parte do inóculo com auxílio da alça bacteriológica de 10µl para tubos de ensaios contendo tubo de Durham invertido e Caldo *E. coli* (EC), identificados. Os tubos de EC foram incubados a 44,5°C - 45°C por 24 horas, efetuando-se a leitura e anotados os tubos positivos (com crescimento e produção de gás). Os tubos positivos foram utilizados na determinação do Número Mais Provável (NMP)/g ou mililitro apropriada às diluições inoculadas, após confirmação pelas provas bioquímicas.

4.4.4.4 Contagem de *E. coli* pelo método tradicional

De cada tubo de EC com produção de gás em 24h, inoculou-se uma porção do inóculo em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), identificadas. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e foi observado se havia desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli* (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico). As colônias típicas foram transferidas para tubos de ensaio contendo Ágar Padrão para Contagem PCA inclinado. Das culturas puras em PCA, realizou-se coloração de Gram, inoculando-as nos meios testes, para realização das provas bioquímicas de Indol, VM, VP e Ágar Citrato de Simmons.

- **Teste de Citrato de Simmons:** Transferiu-se parte do inóculo da cultura para o ápice dos tubos de Ágar Citrato de Simmons e incubando-os a 35°C/48h. O crescimento com viragem alcalina, altera a cor do meio de verde para azul, é indicativo de teste positivo. O não crescimento e a não alteração da cor do meio indicam teste negativo.

- **Teste de indol:** com auxílio de uma agulha bacteriológica foi transferido uma parte do inoculo da cultura aos tubos de Ágar SIM (a inoculação foi feita por picada) e incubando-os a 35°C/24h. Adicionou-se 05 gotas do reagente de Kovacs na superfície do meio, observando o desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo) ou se o anel permanece na cor amarela do reagente (teste negativo). As cepas de *E. coli* podem ser indol positivas ou negativas.

- **Teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer (caldo VM-VP):** inoculou-se uma parte do inoculo nos tubos de caldo MR-VP e incubando-os a 35°C/48h. Para o teste de VP, transferiu-se assepticamente 1,0 mL da cultura para um tubo de ensaio onde adicionou-se 0,6mL de solução de α -naftol 5% e 0,2 mL de solução de KOH 40%, homogeneizou-se e aqueceu, deixou esfriar e observou se havia desenvolvimento de uma cor vermelha ou rósea no meio de cultura (teste positivo). A permanência do meio na cor do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo. As cepas de *E. coli* são VP negativas. Incubou-se a cultura remanescente no caldo MR-VP por 48 horas adicionais e foram acrescentados ao tubo 5 gotas da solução de vermelho de metila, observando imediatamente se o meio adquiria uma coloração vermelha (teste positivo) ou amarela (teste negativo). As cepas de *E. coli* são VM positivos.

Considerou-se como *E. coli* todas as culturas com as seguintes características: bastonetes Gram negativos, indol (+) ou (-), VM (+), VP (-) e citrato (-). Após a confirmação da presença de *E. coli*, determinou-se o NMP/g ou mL conforme Silva; Junqueira; Silveira, (2001).

4.4.4.5 Pesquisa de *E. coli* diarreiogênica

As cepas de *E. coli* isoladas foram testadas através de reações de aglutinação rápida. Foi feita uma suspensão bem espessa da cepa *E. coli*, após confirmação pelo método tradicional em 0,5mL de solução de salina 0,85% estéril. Transferiu-se atrás do bico de bunsen uma alíquota de 25 μ L em cinco orifícios demarcados da placa de CLAYNE. Adicionou-se uma gota dos soros polivalentes

preparados em coelhos para identificação dos sorogrupos de *E. coli* enteroinvasora (EIEC), na presença de soro Polivalente A (contendo anticorpos contra as *E. coli* O28ac, O29, O136, O144 e O152) e soro Polivalente B (contendo anticorpos contra as *E. coli* O112ac, O124, O143, O164 e O167) e sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica clássica associados à diarreia infantil (EPEC), na presença de soro Polivalente A (contendo anticorpos contra as *E. coli* O26, O55, O111 e O119), soro Polivalente B (contendo anticorpos contra as *E. coli* O114, O125, O142 e O158) e soro Polivalente C (contendo anticorpos contra as *E. coli* O86, O126, O127 e O128), homogeneizando-se em agitador orbital por dois minutos, observou-se a reação no microscópio onde foi considerado positivo (presença de aglutinação) e negativo (ausência de aglutinação). Todos os soros utilizados contêm anticorpos contra antígenos O e antígenos superficiais do tipo K, aglutinando bem culturas homólogas vivas e aquecidas, resultando em reações rápidas e, de modo geral, completas, de acordo com o fabricante PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.

4.4.5 Detecção de *Salmonella* spp.

4.4.5.1 Enriquecimento em caldo seletivo

Após a fase de pré-enriquecimento descrita no item 3.3 foi realizado o enriquecimento seletivo, transferindo 1mL do pré-enriquecimento para um tubo de ensaio contendo 09mL Caldo Tetrionato (TT) ativado com solução de iodo/iodeto a 2% e o mesmo a outro tubo de ensaio contendo 09mL de Caldo Selenito Cistina (SC). Incubou-os a 35°C por 24 horas, em seguida de cada tubo foi estriado um leve inoculo da cultura nos meios Ágar Verde Brilhante Bile (VB) e o Ágar Salmonella-Shigella (SS).

4.4.5.2 Confirmação preliminar das colônias típicas de *Salmonella* spp.

Com o auxílio de uma agulha bacteriológica transferiu-se um leve inoculo da cultura para os tubos inclinados de Agar Lisina Ferro (LIA) e Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). A inoculação foi feita por picada e estrias na ápice, de ambos os tubos. De acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001) o repique do inoculo foi realizado de uma vez só sem flambar ou pegar outra colônia entre um tubo e outro. Submeteu-se à confirmação preliminar duas colônias típicas de cada placa e VB e SS, nos tubos de LIA e TSI. Incubou os tubos a 35°C por 24 horas e observou-se a ocorrência de reação típica de *Salmonella* spp:

-Reação típica de *Salmonella* spp em TSI: ápice alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do Agar). Reação atípica em TSI, não foi descartada quando as reações em LIA se apresentaram típicas: ápice e fundo ácidos (amarelos), com ou sem produção de H₂S.

-Reação típica de *Salmonella* spp em LIA: fundo e ápice alcalinos (púrpura, sem alterações da cor do meio), com ou sem produção de H₂S. Reação atípica em LIA, não foi descartada quando as reações em TSI apresentaram-se típicas: fundo amarelado com ápice alcalina, com ou sem produção de H₂S (SILVA; JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2001).

De cada colônia suspeita foi realizada a coloração de GRAM.

Para confirmação das cepas de *Salmonella* spp., foram utilizados o soro polivalente anti-Salmonella Somático (contendo anticorpos contra os antígenos O dos grupos A, B, C, D, E e o antígeno Vi) e soro polivalente anti-Salmonella Flagelar (contendo anticorpos contra os antígenos H: a; b; c; d; i; 1, 2, 5), conforme descrito no item 3.4.3.3.2.

4.5 MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

Utilizando-se das cepas de *S. aureus* e *E. coli* recuperadas em Ágar PCA inclinado isoladas na referente pesquisa. Cada cepa testada foi inoculada em tubo

contendo 5mL de solução salina 0,85% até que se obteve uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala de McFarland ($1,0 / 2,0 \times 10^8$ UFC/mL). A cultura foi semeada com auxílio de *swab* estéril em placas de Petri (20x140 mm) contendo Ágar Muelher-Hinton (MH). Após a secagem foi disposto na superfície do meio de cultura o multidisco contendo 12 discos de antibióticos (Laborclin), sendo as combinações estabelecidas aos critérios do (*Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, 2010).

As placas inoculadas foram invertidas e incubadas a 35 °C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, foi realizada a leitura por meio da medida dos halos de inibição do desenvolvimento bacteriano, comparando-as aos valores estabelecidos na tabela padrão, sendo classificadas quanto à sensibilidade aos mesmos (sensível, resistência intermediária e resistente), de acordo com o (CLSI, 2010).

Para controle de qualidade dos testes foram utilizadas cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection): *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* 25923 fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE/UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto - SP.

4.6 ANÁLISE PARASITOLÓGICA

Na presente pesquisa, utilizou-se o método de sedimentação espontânea de Hoffman, Pons e Janer (1934) adaptado para avaliação parasitológica em alimentos em função de sua eficiência na detecção de um maior número de formas parasitárias, como ovos, larvas e cistos, sendo também de execução simples e baixo custo (NEVES, et al., 2005).

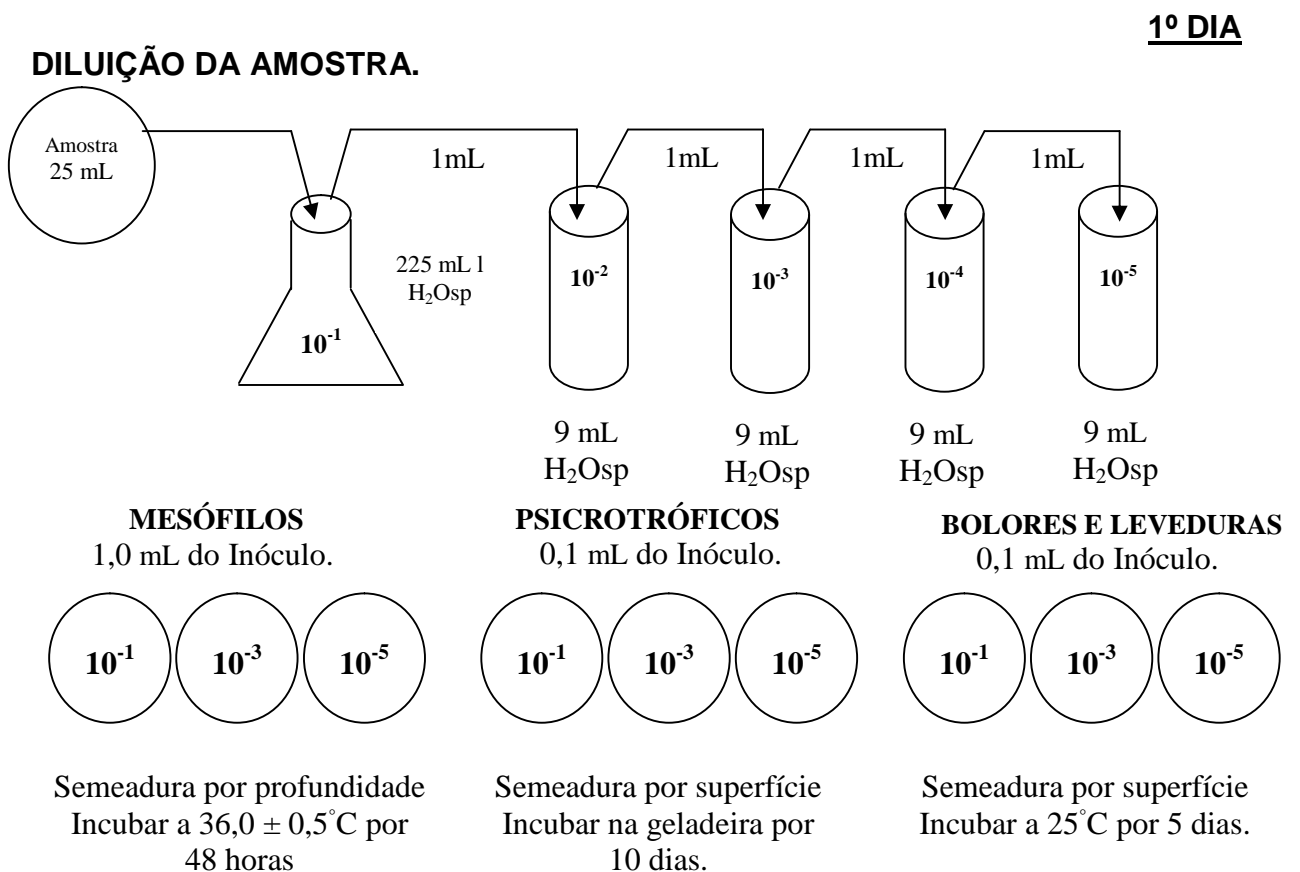
Utilizou-se de todos os EPis (jaleco, touca, máscara, luva de procedimento, óculos de proteção) e percorrido o tempo de análise microbiológica da amostra, facilitando a liberação do parasita na solução diluente de água peptonada 0,1%. O montante da diluição inicial então foi filtrado por uma peneira plástica contendo uma gaze cirúrgica dobrada em quatro num cálice próprio de sedimentação e quando

necessário completou-se o volume do cálice com água destilada estéril, deixando-o, em seguida, em repouso por 24 horas para que ocorresse a sedimentação. Após a sedimentação desprezou-se o líquido sobrenadante cuidadosamente, homogeneizou-se o sedimento e com auxílio de um canudo plástico foi transferida uma gota do mesmo sobre uma lâmina de vidro, analisou-se a fresco e corado com solução de lugol. O sedimento foi analisado em triplicata, utilizando-se as objetivas 10x e 40x em todos os campos da lâmina, para a identificação das estruturas parasitárias.

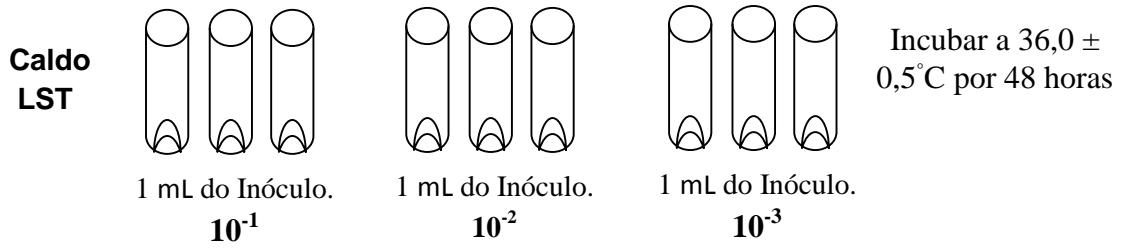
A análise parasitológica da água foi realizada diretamente das amostras, sem que sofressem qualquer procedimento prévio, sendo empregado o mesmo método da alface.

4.7 ROTEIRO DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS

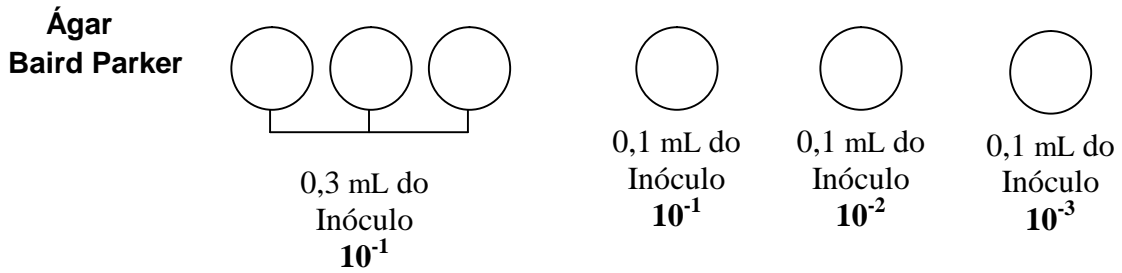
4.7.1 Roteiro das análises microbiológicas da alface



COLIFORMES TOTAIS (teste Presuntivo).

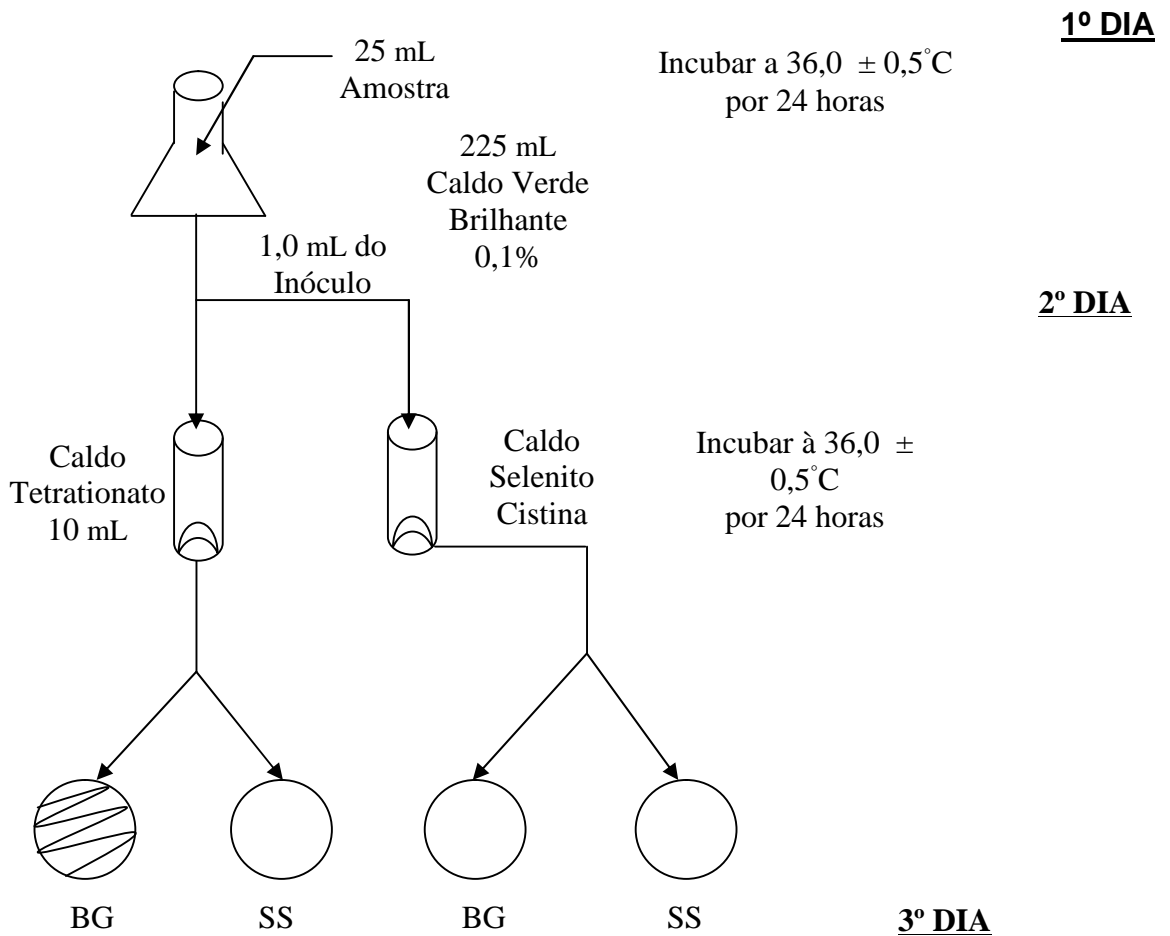


STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA.



Incubar a 35°C por 48 horas.

SALMONELLA SPP.



OBSERVAÇÃO: No 2º dia devem ser verificados todos os testes que estão Incubados, os que apresentarem crescimento seguirão seqüência nas análises.

3º DIA

MESÓFILOS
1,0 mL do Inóculo.

PSICOTRÓFICOS
0,1 mL do Inóculo.

BOLORES E LEVEDURAS
0,1 mL do Inóculo.

Contar as colônias com
Crescimento

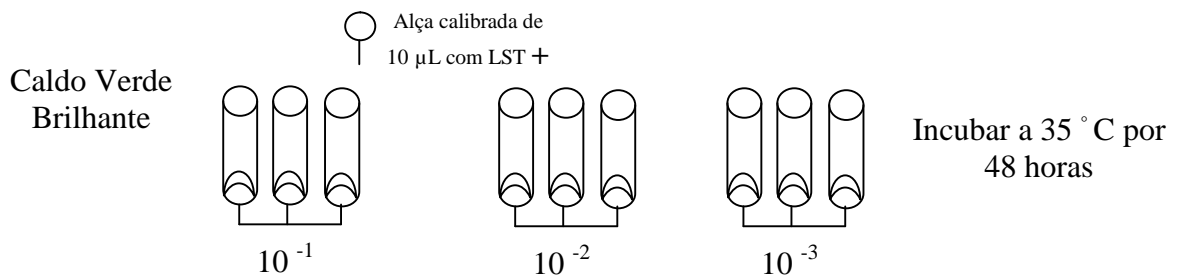
Apenas Observar

Apenas Observar

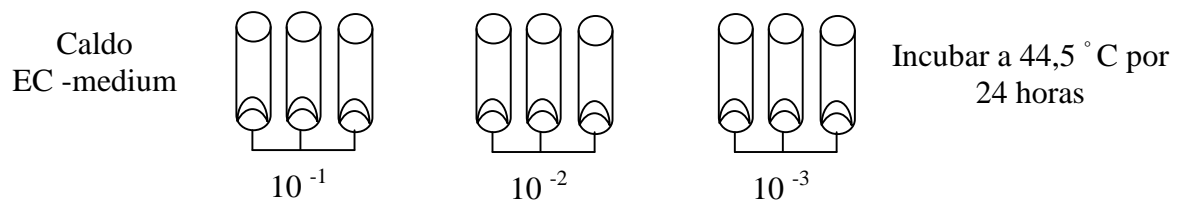
COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES.

Dos tubos com crescimento e presença de gás, deverá ser inoculada uma alça carregada com o Inóculo do LST com crescimento nos testes a seguir:

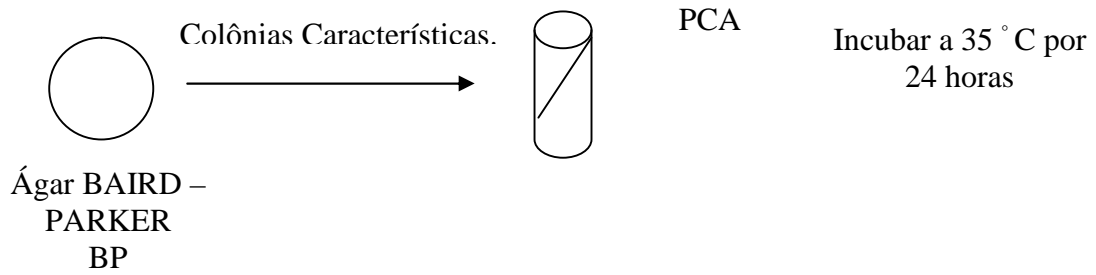
TESTE CONFIRMATIVO PARA COLIFOMES TOTAIS.



TESTE CONFIRMATIVO PARA COLIFOMES TERMOTOLERANTES.



STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA



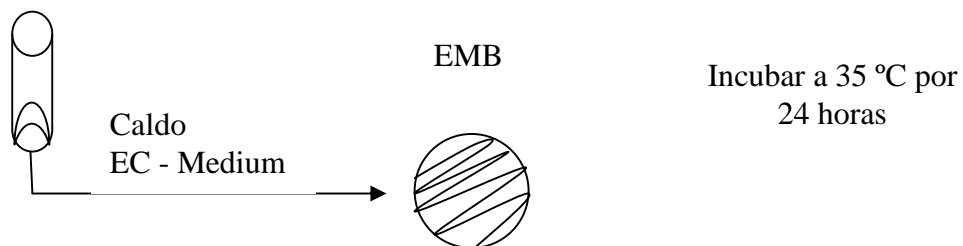
4º DIA

BOLORES E LEVEDURAS.

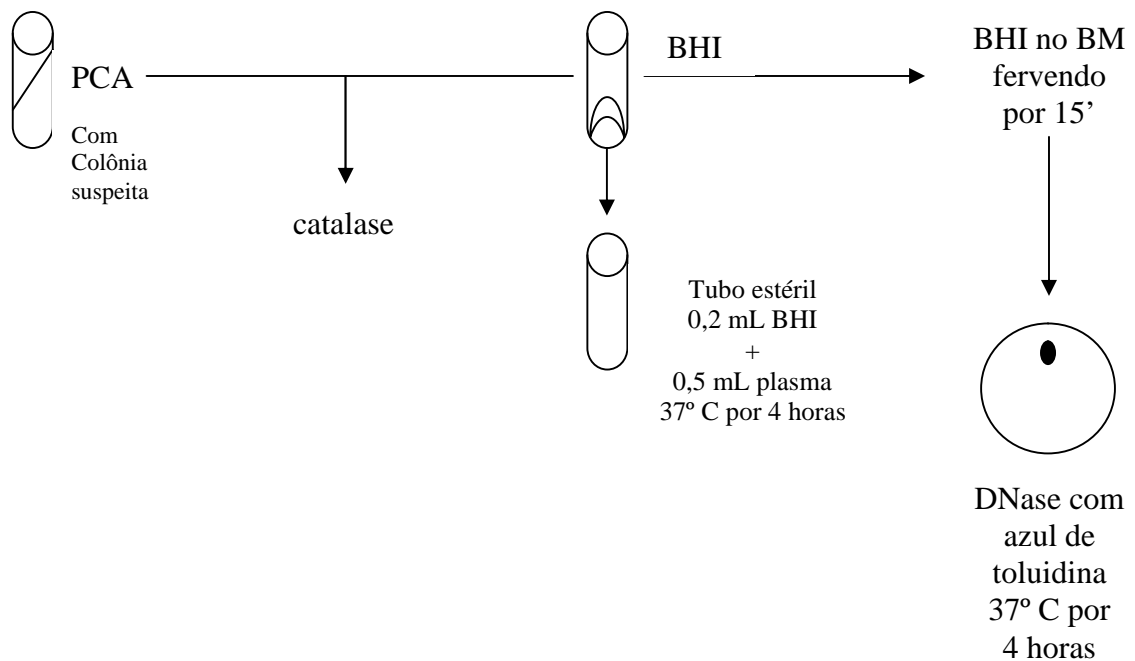
Apenas observar.

COLIFORMES TERMOTOLERANTES – TESTE CONFIRMATIVO.

Dos tubos com crescimento e presença de gás deverá ser inoculada em placa com meio EMB.

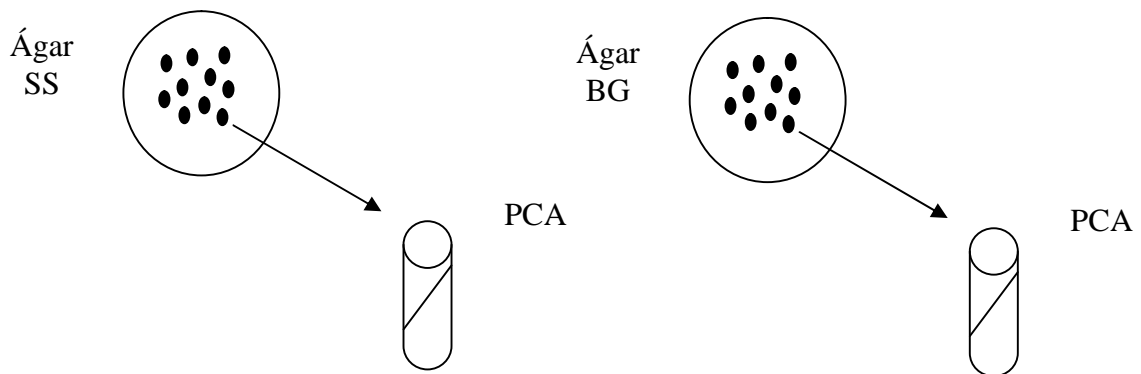


STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA



SALMONELLA spp.

Dos meios Ágar SS e Ágar BG com crescimento de colônias suspeitas (características) de *Salmonella* spp, transferir uma colônia para o Ágar Nutriente ou PCA.

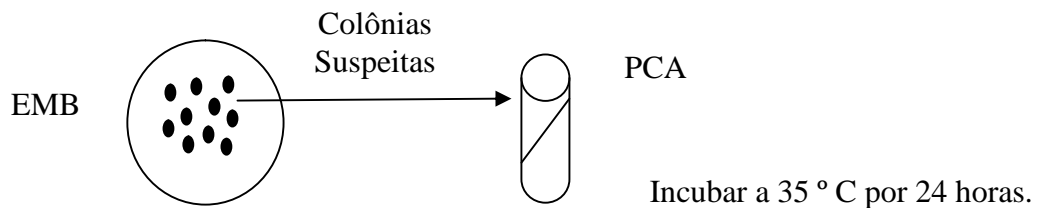


Incubar a 35 ° C por 24 horas.

5º DIA

BOLORES E LEVEDURAS.

Efetuar a contagem das placas que obtiverem crescimento, anotando os valores em UFC/g.

PROVAS BIOQUÍMICAS PARA CONFIRMAÇÃO DOS COLIFORMES TERMOTOLERANTES (*Escherichia coli*).

STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA.

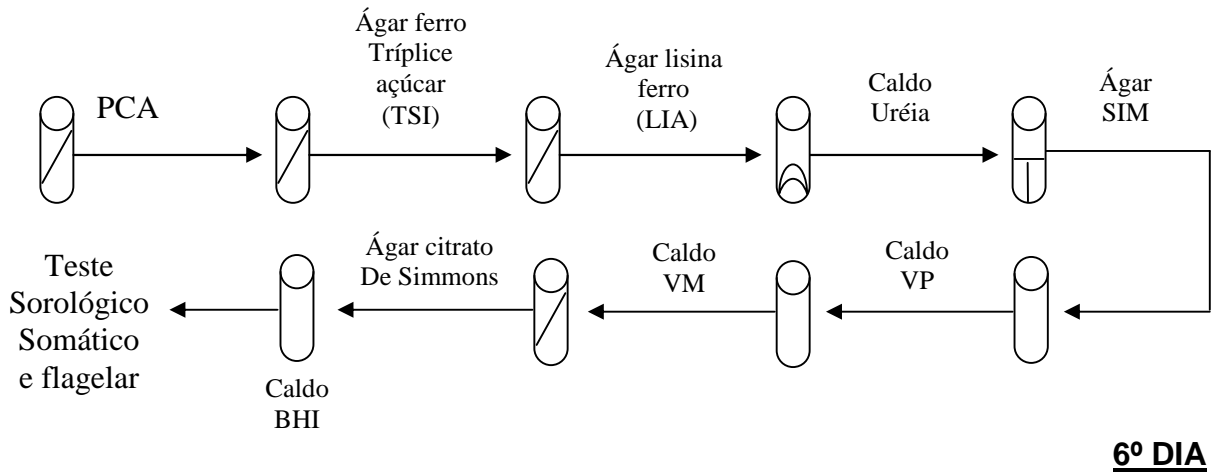
Efetuar a leitura das provas-bioquímicas e confirmar se o microrganismo isolado realmente é o *Staphylococcus aureus*.

COAGULASE +

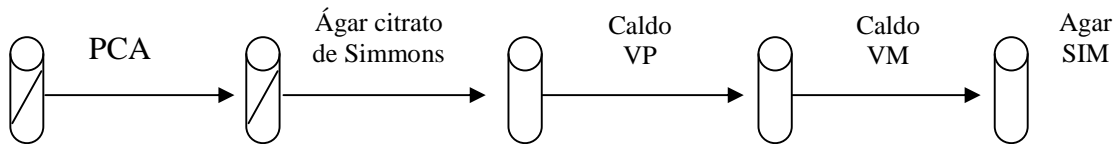
CATALASE +

DNase +

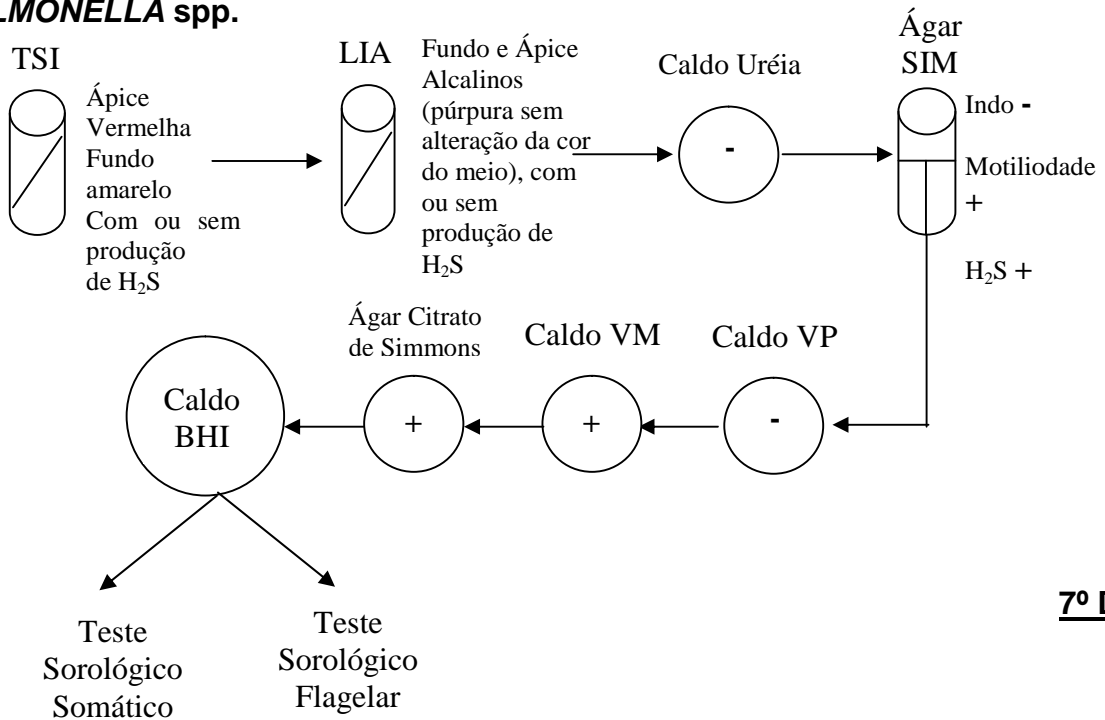
SALMONELLA spp.



COLIFORMES TERMOTOLERANTES (*Escherichia coli*).

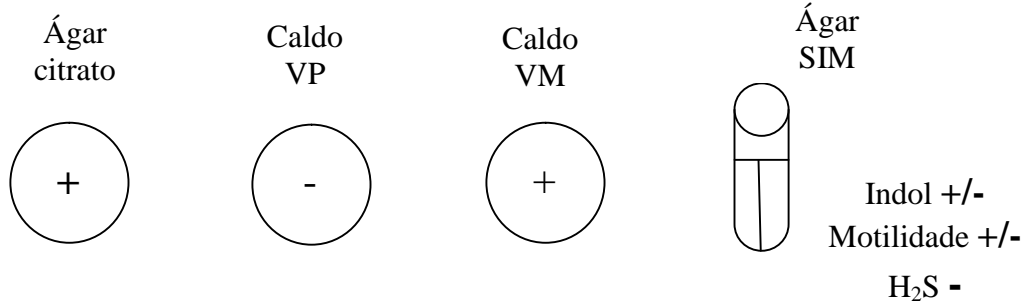


SALMONELLA spp.



COLIFORMES TERMOTOLERANTES (*Escherichia coli*).

Efetuar a leitura as provas-bioquímicas e confirmar se o microrganismo isolado realmente é o *Escherichia coli*.



10º DIA

PSICOTRÓFICOS.

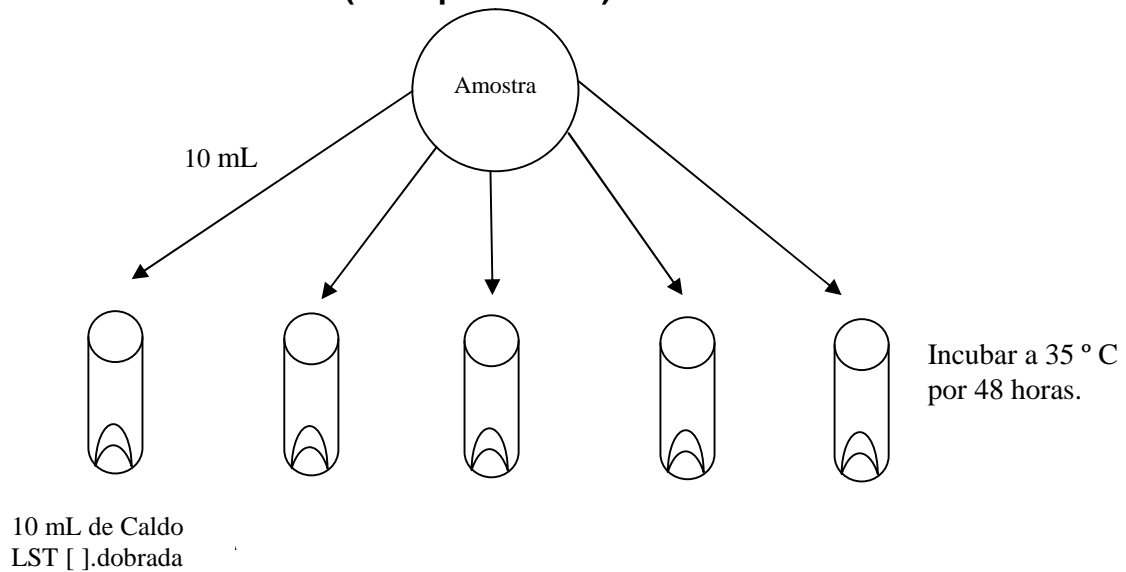
Efetuar a contagem das placas que obtiverem crescimento, anotando os valores em UFC/g.

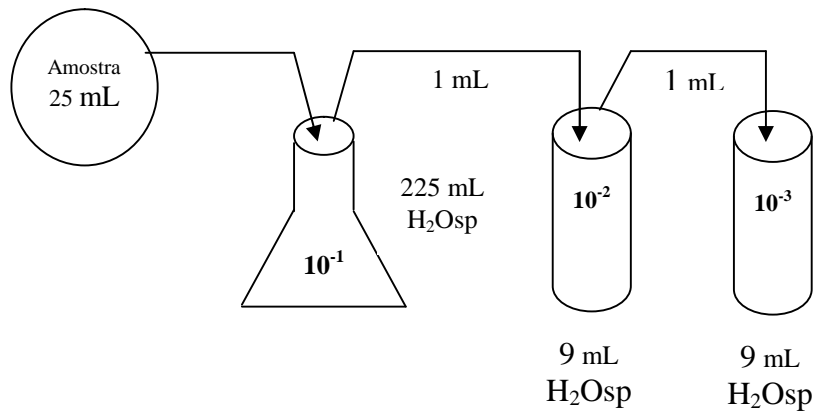
4.7.2 Roteiro das análises microbiológicas da água

1º DIA

AMOSTRA 500mL

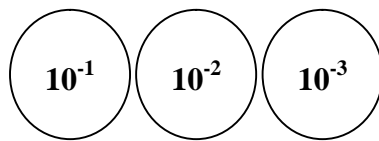
COLIFORMES TOTAIS (teste presuntivo)





MESÓFILOS.

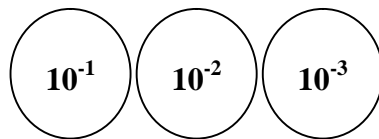
(1,0 mL do Inóculo) - Semeadura por profundidade.



Incubar a 35 ° C por 48 horas.

PSICROTRÓFICOS.

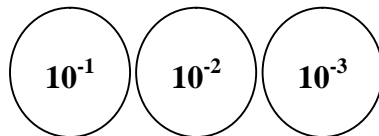
(0,1 mL do Inóculo) - Semeadura em superfície.



Incubar na geladeira por 10 dias.

BOLORES E LEVEDURAS.

(0,1 mL do Inóculo) - Semeadura em superfície.



Incubar a 25 ° C por 05 dias.

3º DIA

MESÓFILOS.

Efetuar a contagem das placas que obtiverem crescimento, anotando os valores em UFC/g.

PSICROTRÓFICOS.

Apenas observar.

BOLORES E LEVEDURAS.

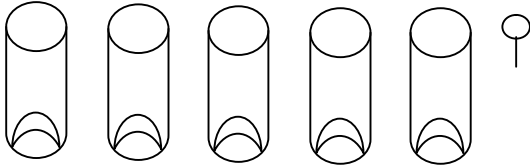
Apenas observar.

COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES.

Dos tubos com crescimento e presença de gás, deverá ser inoculada uma alça carregada com inóculos do LST [] dobrada com crescimento nos testes a seguir:

TESTE CONFIRMATIVO (coliformes totais).

Caldo Verde
Brilhante

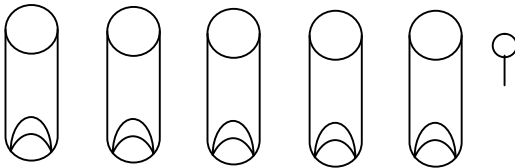


01 alça calibrada de 10 mL
Com caldo LST [] dobrada +

Incubar a 35 ° C por 48
horas.

TESTE CONFIRMATIVO (coliformes termotolerantes).

Caldo
EC - Medium



01 alça calibrada de 10 mL
Com caldo LST [] dobrada+

Incubar a 44,5 ° C por 24
horas em banho-maria.

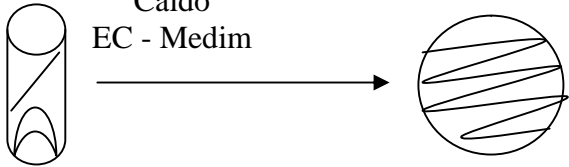
4º DIA**BOLORES E LEVEDURAS.**

Apenas observar.

TESTE CONFIRMATIVO (coliformes termotolerantes).

Dos tubos com crescimento e presença de gás deverá ser inoculada em placa com meio EMB.

Caldo
EC - Medium



Incubar a 35 ° C
por 24 horas.

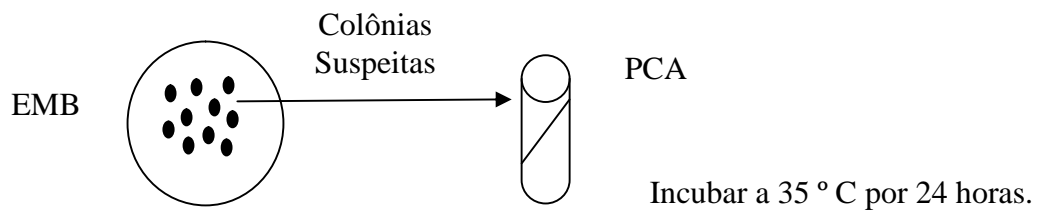
EMB

5º DIA

BOLORES E LEVEDURAS.

Efetuar a contagem das placas que obtiverem crescimento, anotando os valores em UFC/mL.

COLIFORMES TERMOTOLERANTES (*Escherichia coli*).

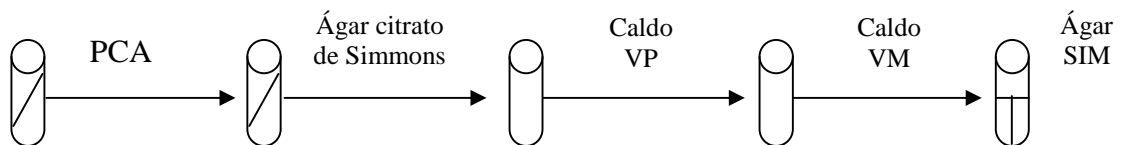


COLIFORMES TOTAIS – TESTE CONFIRMATIVO.

Anotar os tubos de verde brilhante com crescimento e presença de gás.

6º DIA

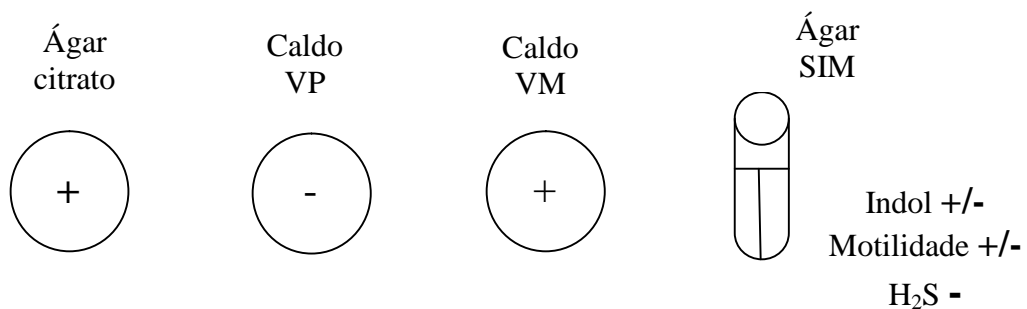
COLIFORMES TERMOTOLERANTES (*Escherichia coli*).



7º DIA

COLIFORMES TERMOTOLERANTES (*Escherichia coli*).

Efetuar a leitura das provas-bioquímicas e confirmar se o microrganismo isolado realmente é o *Escherichia coli*.



10º DIA

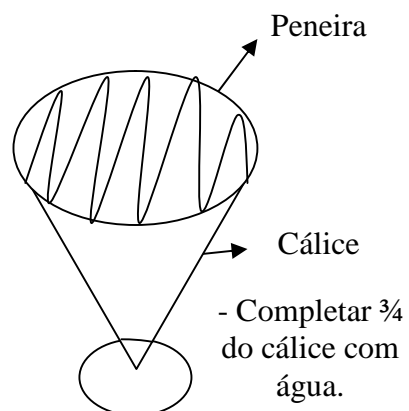
PSICROTRÓFICOS.

Efetuar a contagem das placas que obtiveram crescimento, anotar os valores em UFC/mL.

4.7.3 Roteiro das análises parasitológica da alface

MÉTODO DE HOFFMAN.

- Adicionar H₂O destilada na embalagem contendo o alface;
- Transferir a água para um cálice;

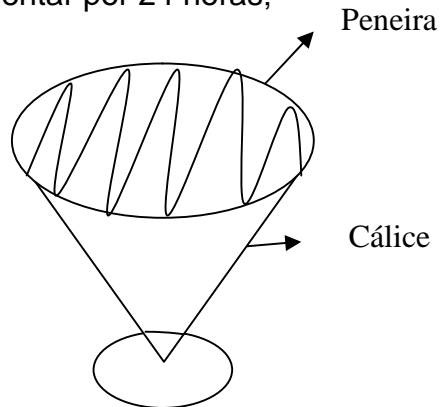


- Deixar sedimentar por 24 horas;
 - Desprezar cuidadosamente todo o líquido sobrenadante;
 - Homogeneizar o sedimento e adicionar uma gota em lâmina de vidro;
 - Analisar a lâmina no microscópio
- Obs: Analisar três lâminas de cada sedimento.

4.7.4 Roteiro das análises parasitológica da água

MÉTODO DE HOFFMAN.

- Transferir a amostra de água para um cálice;
- Deixar sedimentar por 24 horas;



- Desprezar cuidadosamente todo o líquido sobrenadante;
 - Homogeneizar o sedimento e adicionar uma gota em lâmina de vidro;
 - Analisar a lâmina no microscópio
- Obs: Analisar três lâminas de cada sedimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Usualmente a alface é consumida crua tendo no processo de higienização o único tratamento recebido entre o cultivo e o consumo. Se os processos de limpeza e sanificação forem conduzidos de forma inadequada, poderão propiciar a transmissão de diversas doenças. Em 1991, o surgimento da epidemia de cólera no Brasil despertou o interesse pelo assunto, tanto pelas autoridades sanitárias quanto pela população em geral (NASCIMENTO, 2002).

A prevenção de riscos de contaminação por agentes patogênicos em folhas de alface passa pelas boas práticas agrícolas que vão desde a semeadura até a colheita além de outros importantes aspectos, ainda no processo do cultivar, como qualidade da água usada para irrigação, emprego de práticas sanitárias adequadas pelos produtores na manipulação das plantas e higiene do agricultor no campo. Manter a segurança de contaminação bacteriana de frutas e de vegetais frescos requer um conhecimento de sistemas que abranja todos os aspectos da produção, do processamento, da distribuição e do uso (MOGHARBEL e MASSON, 2005).

Com raras exceções, geralmente a microbiota dos vegetais retirados da terra é a mesma do solo onde cresceram. A alta quantidade de água presente nos vegetais favorece a deterioração bacteriana e o baixo conteúdo de carboidratos e gorduras sugere que uma boa parte dessa água está disponível. O pH dos vegetais em média está dentro dos limites de crescimento de várias bactérias, o que as tornam os agentes de decomposição mais comuns nos vegetais. O potencial de oxirredução relativamente alto dos vegetais e sua baixa toxicidade sugere que as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas são mais importantes do que as anaeróbias (JAY, 2005).

As Tabelas 2, 3 e 4 estão representando as análises microbiológicas da alface (*Lactuca sativa*) e da água de lavagem dessas hortaliças, analisadas nesta pesquisa.

Tabela 2 - Resultados das análises dos microrganismos coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp, pesquisados na alface (*Lactuca sativa*)

Fonte	Microrganismos			
	Coliformes totais NMP/g	Coliformes Termotolerantes NMP/g	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva UFC/g	<i>Salmonella</i> ssp.
Horta A				
1 ^a	15	0,9	ausência	ausência em 25g
2 ^a	1,5	< 0,3	3,5x10 ²	ausência em 25g
3 ^a	15	1,5	ausência	ausência em 25g
4 ^a	15	0,9	2,8x10 ²	ausência em 25g
5 ^a	0,4	< 0,3	1,0x10 ²	ausência em 25g
Horta B				
1 ^a	21	1,5	9,0x10 ³	ausência em 25g
2 ^a	24	< 0,3	ausência	ausência em 25g
3 ^a	≥ 240	< 0,3	ausência	ausência em 25g
4 ^a	≥ 240	46	ausência	ausência em 25g
5 ^a	7,5	4,3	1,8x10 ²	ausência em 25g
Horta C				
1 ^a	0,4	< 0,3	ausência	ausência em 25g
2 ^a	0,4	< 0,3	ausência	ausência em 25g
3 ^a	< 0,3	< 0,3	ausência	ausência em 25g
4 ^a	< 0,3	< 0,3	ausência	ausência em 25g
5 ^a	≥ 240	< 0,3	1,1x10 ⁴	ausência em 25g
Horta D				
1 ^a	46	< 0,3	71,4x10 ¹	ausência em 25g
2 ^a	≥ 240	< 0,3	ausência	ausência em 25g
3 ^a	110	< 0,3	ausência	ausência em 25g
4 ^a	1,1	< 0,3	1,5x10 ⁶	ausência em 25g
5 ^a	9,3	< 0,3	ausência	ausência em 25g
Restaurante				
1 ^a	1,5	< 0,3	6,0x10 ²	ausência em 25g
2 ^a	≥ 240	< 0,3	ausência	ausência em 25g
3 ^a	≥ 240	24	ausência	ausência em 25g
4 ^a	24	< 0,3	ausência	ausência em 25g
5 ^a	110	4,3	ausência	ausência em 25g

Legenda: Horta A e B cultivo tradicional no solo; Horta C e D cultivo hidropônico.

Mesmo não existindo padrões federais para coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, para hortaliças frescas, “in natura”, inteiras, selecionadas ou não e da água de lavagem delas, a análise dos mesmos fornece dados sobre as condições higiênico-sanitárias do ambiente e

manejo, proporcionando informações valiosas para conscientizar todos os envolvidos, pois este grupo de bactérias pode ser encontrado na natureza e no intestino de mamíferos, inclusive o homem, podendo ser bactérias entéricas patogênicas.

Tabela 3 - Resultados das análises dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicotróficos, bolores e leveduras, pesquisados na alface (*Lactuca sativa*).

Fonte	Microrganismos		
	Aeróbios mesófilos UFC/g	Aeróbios psicotróficos UFC/g	Bolores e Leveduras UFC/g
Horta A			
1 ^a	4,9x10 ⁵	< 10 ^{est.}	3,1x10 ⁶
2 ^a	3,3x10 ⁵	< 10 ^{est.}	9,7x10 ⁵
3 ^a	4,1x10 ⁵	< 10 ^{est.}	2,2x10 ⁶
4 ^a	9,0x10 ⁴	< 10 ^{est.}	4,3x10 ⁵
5 ^a	3,4x10 ⁵	< 10 ^{est.}	8,7x10 ⁵
Horta B			
1 ^a	7,3x10 ⁶	< 10 ^{est.}	1,3x10 ⁶
2 ^a	8,3x10 ⁶	< 10 ^{est.}	1,6x10 ⁶
3 ^a	1,5x10 ⁵	< 10 ^{est.}	6,7x10 ⁵
4 ^a	2,3x10 ⁵	< 10 ^{est.}	7,9x10 ⁵
5 ^a	1,7x10 ⁵	< 10 ^{est.}	1x10 ⁵
Horta C			
1 ^a	1,7x10 ⁵	< 10 ^{est.}	1,5x10 ⁴
2 ^a	3,9x10 ⁵	< 10 ^{est.}	1,8x10 ⁶
3 ^a	1,1x10 ⁵	< 10 ^{est.}	2,3x10 ³
4 ^a	1,4x10 ⁵	< 10 ^{est.}	1,1x10 ⁶
5 ^a	5,0x10 ⁴	< 10 ^{est.}	3,1x10 ⁵
Horta D			
1 ^a	24,5x10 ⁴	< 10 ^{est.}	2,3x10 ⁴
2 ^a	16,5x10 ⁶	< 10 ^{est.}	13,6x10 ⁴
3 ^a	6,5x10 ⁶	< 10 ^{est.}	3,2x10 ⁵
4 ^a	5,5x10 ⁶	< 10 ^{est.}	2,9x10 ⁵
5 ^a	17,5x10 ⁵	< 10 ^{est.}	1,0x10 ⁶
Restaurante			
1 ^a	13,8x10 ²	< 10 ^{est.}	7,5x10 ⁴
2 ^a	1,7x10 ⁷	< 10 ^{est.}	1,5x10 ⁵
3 ^a	6,1x10 ⁶	< 10 ^{est.}	2,3x10 ⁵
4 ^a	4x10 ⁶	< 10 ^{est.}	1,4x10 ⁶
5 ^a	8,3x10 ⁶	< 10 ^{est.}	9,8x10 ³

Legenda: Horta A e B cultivo tradicional no solo; Horta C e D cultivo hidropônico.

Conforme a Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001), as hortaliças cruas, preparadas para o consumo direto, não devem apresentar *Salmonella* spp/25g do produto e Coliformes Termotolerantes a indicativa de 10^2 UFC/g. Já na análise realizada “in natura”, inteiras (não preparadas) não devem apresentar *Salmonella* spp/25g do produto.

A alta contagem de microrganismos heterotróficos (aeróbios mesófilos, aeróbios psicotróficos, bolores e leveduras) indica contaminação da matéria-prima ou do processo insatisfatório, sob o ponto de vista sanitário, desde a produção da matéria-prima ao beneficiamento para obtenção do produto pronto para consumo.

Tabela 4 - Resultados das análises microbiológicas da água de lavagem das hortaliças.

Fonte	Microrganismos				
	Coliformes totais NMP/100mL	Coliformes termotolerantes NMP/100mL	Aeróbios mesófilos UFC/100mL	Aeróbios psicotróficos UFC/100mL	Bolores e leveduras UFC/100mL
Horta A					
1 ^a	>16	< 0,3	$1,4 \times 10^5$	< $10^{\text{est.}}$	$1,3 \times 10^5$
2 ^a	>16	< 0,3	$8,1 \times 10^4$	< $10^{\text{est.}}$	$8,0 \times 10^4$
3 ^a	>16	< 0,3	$1,1 \times 10^5$	< $10^{\text{est.}}$	$1,3 \times 10^5$
4 ^a	>16	16	$3,2 \times 10^5$	< $10^{\text{est.}}$	$1,1 \times 10^5$
5 ^a	>16	9,2	$3,6 \times 10^5$	< $10^{\text{est.}}$	$6,6 \times 10^3$
Horta B					
1 ^a	>16	5,1	$9,7 \times 10^4$	< $10^{\text{est.}}$	$2,1 \times 10^5$
2 ^a	>16	5,1	$1,3 \times 10^5$	< $10^{\text{est.}}$	$2,4 \times 10^5$
3 ^a	>16	2,2	$2,0 \times 10^5$	< $10^{\text{est.}}$	$2,3 \times 10^5$
4 ^a	<2,2	<2,2	< 10	< $10^{\text{est.}}$	2×10^2
5 ^a	>16	<2,2	$2,4 \times 10^5$	< $10^{\text{est.}}$	$2,1 \times 10^4$
Horta C					
1 ^a	2,2	<2,2	$1,0 \times 10^3$	< $10^{\text{est.}}$	$1,4 \times 10^4$
2 ^a	2,2	<2,2	$1,3 \times 10^4$	< $10^{\text{est.}}$	$7,0 \times 10^2$
3 ^a	>16	<2,2	$1,5 \times 10^3$	< $10^{\text{est.}}$	$1,6 \times 10^4$
4 ^a	>16	<2,2	$1,7 \times 10^4$	< $10^{\text{est.}}$	$9,7 \times 10^4$
5 ^a	>16	<2,2	$1,2 \times 10^3$	< $10^{\text{est.}}$	$4,8 \times 10^3$
Horta D					
1 ^a	16	<2,2	$23,7 \times 10^2$	< $10^{\text{est.}}$	8
2 ^a	>16	<2,2	$8,2 \times 10^3$	< $10^{\text{est.}}$	< $10^{\text{est.}}$
3 ^a	>16	<2,2	$2,0 \times 10^4$	< $10^{\text{est.}}$	11
4 ^a	2,2	<2,2	$13,7 \times 10^2$	< $10^{\text{est.}}$	2
5 ^a	5,1	<2,2	$16,5 \times 10^2$	< $10^{\text{est.}}$	< $10^{\text{est.}}$

Legenda: Horta A e B cultivo tradicional no solo; Horta C e D cultivo hidropônico.

A água é essencial a vida, porém muitas vezes atua como veículo de doenças ao homem, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica antes de ser utilizada (ISSAC-MARQUES, et al., 1994), tanto para fins de irrigação como para beber ou recreação.

Os resultados das análises da água foram comparados conforme as normas descritas na Portaria MS nº 518/2004.

A maioria dos hortifrutigranjeiros não dispõe de análise de qualidade da água de irrigação, bem como a de lavagem das hortaliças, utilizando água de córregos, poços, mantendo reservatórios em locais inadequados (próximo de curral, etc.) e falta de instruções no manejo, tornando a água a causadora de muitas das contaminações de alimentos, principalmente as folhosas que são consumidas cruas, veiculando enteroparasitas e bactérias, como demonstram as pesquisas de Chistovão (1957) e Almeida (2008).

5.1.1 Coliformes totais

5.1.1.1 Análise de coliformes totais na alface

Apesar de não existirem padrões para contagem de coliformes totais, resultados positivos indicam más condições higiênicas do produto, podendo ser proveniente dos insumos (adubos, água de irrigação, etc), manejo do produtor, condições de transporte e processamento da matéria-prima, demonstrando risco da presença de patógenos entéricos.

No sistema de cultivo em solo de alface, a Horta A apresentou índices de coliformes totais entre 0,4 e 15 NMP/g, conforme a tabela de Número Mais Provável para quantidade de amostra inoculada: 1,0 - 0,1 e 0,01g ou mL (Bacteriological Analytical Manual, 6.ed. Estados Unidos: Foods and Drug Administration, 1984), a Horta B contagens entre 7,5 e ≥ 240 NMP/g. No sistema de cultivo hidropônico, a Horta C apresentou números menores entre $< 0,3$ e ≥ 240 NMP/g, onde apenas uma

das cinco amostras apresentou quantidade elevada de coliformes totais ≥ 240 NMP/g, a Horta D contagens entre 1,1 e ≥ 240 NMP/g, amostras do mesmo lote analisado da Horta D após serem manuseadas pelo restaurante e prontas para consumo apresentaram contagens entre 1,5 e ≥ 240 NMP/g.

Ao comparar as cinco amostras analisadas entre a Horta D e o Restaurante, apenas a primeira amostragem apresentou menor índice de coliformes totais que a horta, as demais análises expressaram valores superiores aos obtidos na horta.

Bonilha (1986); Barros, et al. (1999) e Souto (2005) apresentaram resultados elevados para coliformes totais em seus trabalhos, como os resultados observados nesta pesquisa, o que corresponde a 60% das amostras de alface e 80% das amostras de água, levando as atenções para os possíveis riscos à saúde pública, pois mesmo que não causem doença, este grupo de bactérias habita intestinos de animais mamíferos, inclusive o homem, podendo indicar uma possível contaminação da água e hortaliças com bactérias entéricas patogênicas.

Todas as hortas e o restaurante apresentaram amostras com valores de coliformes totais elevados, sendo 68% (17) com índices acima do parâmetro estabelecido e 32% (8) com índices reduzidos ou ausência. Das amostras com índices elevados 12% (3) pertencem a Horta A, 20% (5) a Horta B, 4% (1) a Horta C, 16% (4) a Horta D e 16% (4) ao restaurante, conforme demonstra a figura 1.

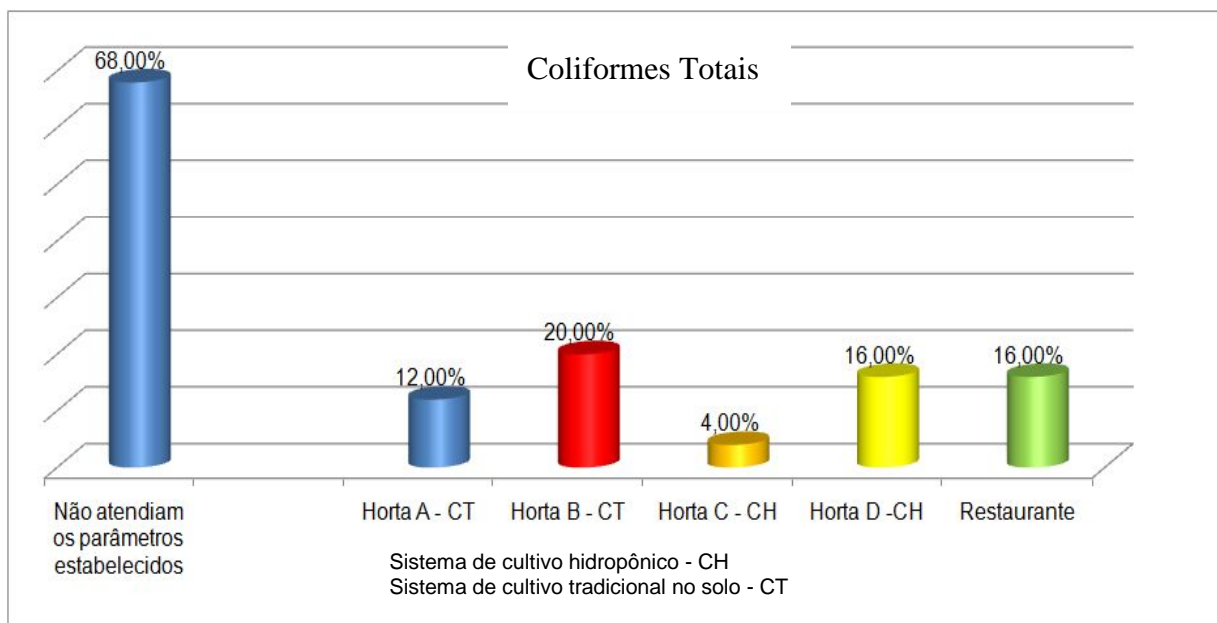


Figura 1- Representa o percentual das amostras de alface com níveis elevados de coliformes totais, conforme os parâmetros estabelecidos de 3NMP/g, referente a dietas enterais na RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Podemos afirmar que o sistema de cultivo por hidroponia apresenta menos contaminação que o de cultivo no solo. Portanto as condições higiênico-sanitárias do cultivo hidropônico são melhores, quando manuseado de maneira satisfatória conforme apresenta a Horta C.

Martins et al. (2008) determinaram através de NMP/g a quantidade de coliformes totais em amostras de alface no município de Bananeiras-PB, as quais apresentaram níveis alto de contaminação. A análise foi realizada com base no mesmo princípio desta pesquisa, quantificar o número desses microrganismos, para saber a respeito da qualidade higiênico-sanitária que chega ao consumidor.

5.1.1.2 Análise de coliformes totais da água

Todas as hortas analisadas apresentaram amostras de água utilizada em seu manejo com crescimento positivo para coliformes totais. A Horta A foi a que apresentou índices mais elevados, sendo todos >16 NMP/100mL, Horta B entre $<2,2$ (ausência) e >16 NMP/100mL, a Horta C (CH) entre 2,2 e >16 NMP/100mL e a Horta D (CH) entre 2,2 e > 16 NMP/100mL.

Considerando os resultados acima, o índice elevado de coliformes totais na água indica a necessidade de reavaliar suas condições de manejo, pois apresenta ambiente propício ao crescimento de patógenos entéricos.

A água de enxágüe de hortaliças da Horta B, que apresentou crescimento $<2,2$ NMP/100mL, foi coletada em 12 de julho, às 14horas e 30minutos, notando que o horticultor tinha lavado os reservatórios de água utilizados no manejo das hortaliças, e captado água tratada pela empresa responsável pelo abastecimento no município, a SABESP.

A figura 2 representa os valores obtidos nas análises microbiológicas para contagem de coliformes totais. Das amostras 95% (19) apresentaram índices elevados de coliformes totais, conforme a Portaria nº 518/2004, onde 25% (5) pertence à Horta A, 20% (4) a Horta B, 25% (5) a Horta C (CH) e 25% (5) a Horta D (CH).

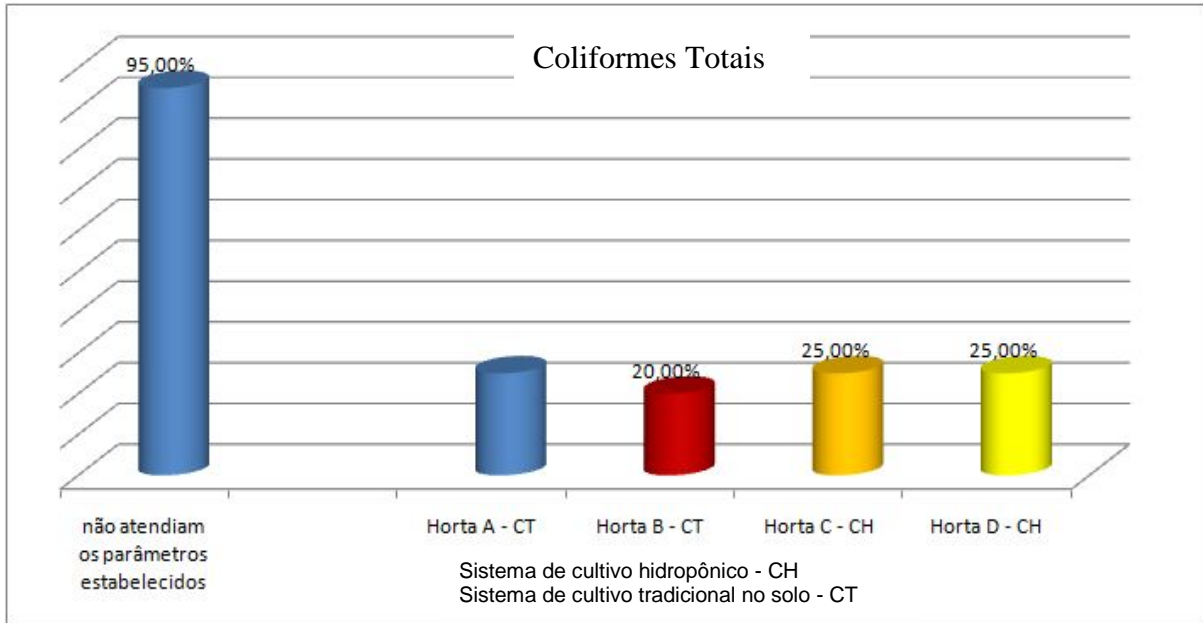


Figura 2 - Percentual de amostra de água, fora dos limites estabelecidos conforme a Portaria MS nº518/2004 (BRASIL, 2004).

De acordo com as análises apresentadas, podemos afirmar que é imprescindível o tratamento e o cuidado com a água de manejo para que não ocorra contaminação cruzada.

Christovão; Laria e Candeias (1967), ao avaliarem amostra de água de irrigação utilizada em hortas de São Paulo, encontraram níveis elevados de coliformes totais superiores aos resultados desta pesquisa.

5.1.2 Análise de coliformes termotolerantes

5.1.2.1 Análise de coliformes termotolerantes na alface

Para coliformes termotolerantes em amostras frescas, “in natura”, inteiras, selecionadas ou não, não existe padrão, sendo utilizado como parâmetro o especificado para hortaliças frescas, “in natura”, preparadas de 10^2 NMP/g, conforme estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2001).

Do total de amostras analisadas, 32% apresentaram crescimento para coliformes termotolerantes, dentro do parâmetro adotado. Deste percentual 12% pertencem a Horta A, 12 % a Horta B e 8% ao restaurante. As Hortas de cultivo hidropônico não apresentaram crescimento de coliformes termotolerantes.

Bonilha (1992) obteve como resultado: alface colhida diretamente do produtor $1,00 \times 10^3$ coliformes totais/g, 8,00 coliformes fecais/g e 2,00 *E.coli*/g, enquanto que em alfaces provenientes de estabelecimentos comerciais os resultados foram: $9,50 \times 10^3$ coliformes totais/g, $1,00 \times 10^2$ coliformes fecais/g e 9,50 *E.coli*/g.

Nascimento et al. (2003) apresentaram níveis de coliformes termotolerantes em alfaces inferiores a 10^4 nas hortaliças comercializadas em Campinas-SP.

Amaro et al. (2006), ao avaliar as condições microbiológicas de alface e agrião no município de Murié - MG, não isolaram bactérias do gênero *Escherichia coli*.

Takayanagui et al. (2000), detectaram elevados níveis de coliformes termotolerantes em 22 hortas das 129 analisadas no município de Ribeirão Preto-SP, sendo as análises realizadas em sua maioria da hortaliça alface. Takayanagui et al. (2007), após implantação de sistema de fiscalização das hortas em Ribeirão Preto-SP, analisaram hortaliças e água de 89 hortas. Das 67 amostras de hortaliças analisadas 41,8% apresentaram níveis de coliformes termotolerantes acima de 10^2 NMP/g, de acordo com ANVISA (BRASIL, 2001).

Castro e Valarini (2007), ao compararem o cultivo convencional com o cultivo orgânico, para enumeração de coliformes termotolerantes em alface (*Lactuca sativa*) lavadas e não lavadas em cidades localizadas a região noroeste da capital São Paulo, obtiveram como resultado índice de contaminação mais elevado nas amostras de cultivo convencional, apesar de todas estarem abaixo do que determina a Resolução RDC 12 (ANVISA, 2001).

Martins et al. (2008) e Oliveira et al. (2006) apresentaram níveis elevados de coliformes termotolerantes acima do que a legislação permite. A presente pesquisa apresentou contaminação em algumas de suas amostras analisadas, sendo todas de cultivo em solo, onde apenas uma encontrava-se fora dos limites adotados como referência.

Considerando os resultados apresentados nesta pesquisa, conclui-se que o sistema de hidroponia apresenta um produto de melhor qualidade, oferecendo menor risco ao consumidor quanto à presença de patógenos entéricos. Comparando

os resultados com as outras pesquisas citadas, o índice de coliformes termotolerantes observado nesta pesquisa apresenta-se em níveis menores. Porém não podemos esquecer-nos da cepa *E. coli* enteroinvasora (EIEC) de soro Polivalente A, ou seja a presença de um enteropatógeno invasivo. (Figura 03)

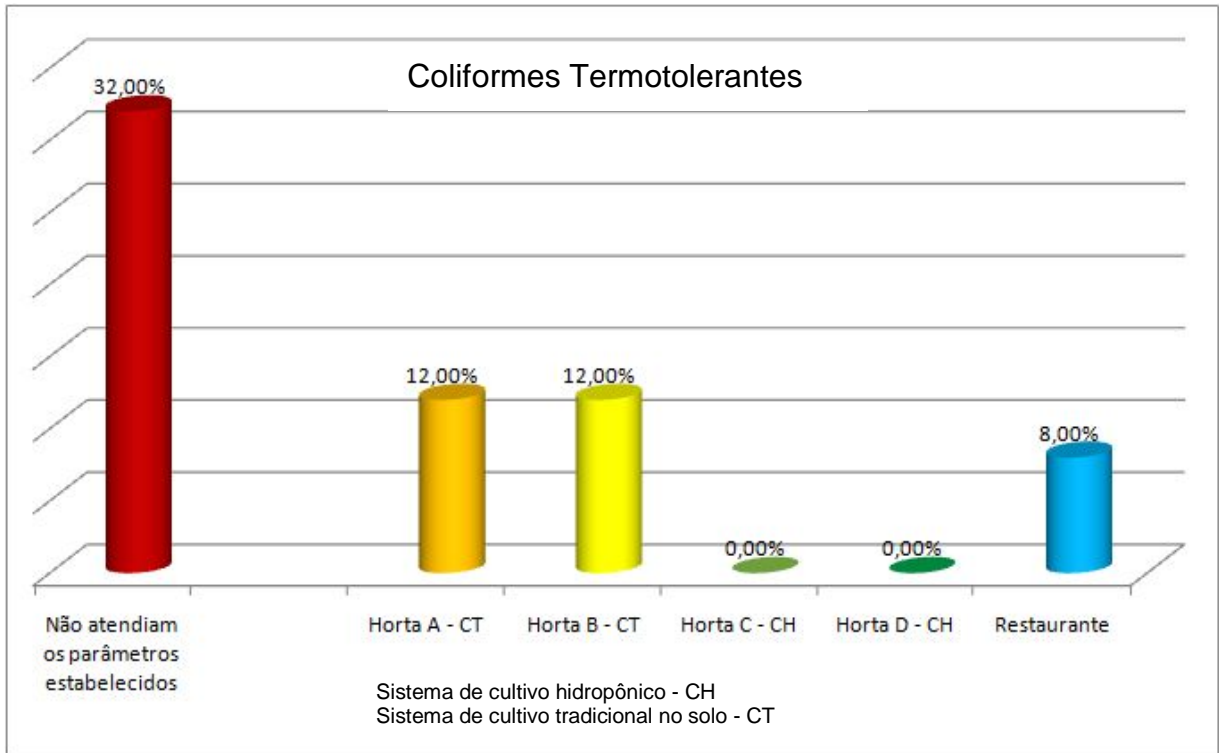


Figura 3 - Análise dos resultados de coliformes termotolerantes provenientes das alfaces que apresentaram dentro dos parâmetros estabelecidos de 10^2 NMP/g, conforme a RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

5.1.2.2 Análise de coliformes termotolerantes da água

As análises microbiológicas para enumeração de coliformes termotolerantes apresentaram 20% (5) das amostras com crescimento positivo e 80% (20) com crescimento negativo. Das amostras positivas, 8% (2) pertencem a Horta A, apresentando resultado entre <2,2 a 16 NMP/100mL; 12% (3) da Horta B apresentando resultado entre <2,2 a 5,1 NMP/100mL, sendo ambas de cultivo no solo. A Horta C e D de sistema de cultivo hidropônico não apresentaram crescimento

para coliformes termotolerantes, tendo seus resultados apresentados $<2,2$ NMP/100mL (ausência), de acordo com a tabela de Número Mais Provável (NMP) (AMERICAN PUBLIC HEALTH OF WATER AND WASTEWATER. **Standard Methods for the Examination of water and Wastewater, 16.ed.** Washington: American Public Health Association, 1985).

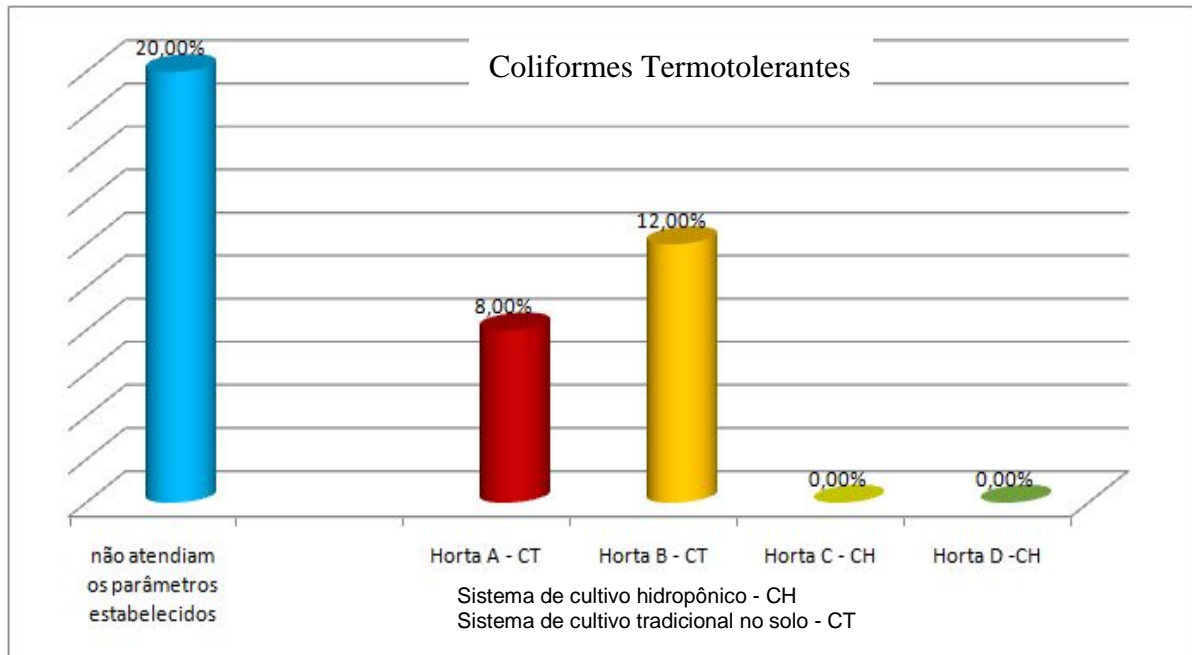


Figura 4 - Percentual de amostra de água, fora dos limites estabelecidos conforme a Portaria MS nº518/2004 (BRASIL, 2004).

Analisando a figura 04, podemos continuar afirmando que o sistema de cultivo hidropônico apresenta melhores condições higiênico-sanitárias do que o sistema de cultivo no solo. Independente do sistema de cultivo é relevante estar sempre atento a necessidade de uma reestruturação no sistema de captação, armazenamento e utilização da água, evitando contaminações cruzadas.

Christovão; Laria e Candeias (1967) ao avaliarem amostras de água de irrigação utilizada em hortas de São Paulo-SP encontraram níveis elevados de coliformes termotolerantes, superiores aos resultados obtidos nesta pesquisa.

Souto (2005), ao analisar água de irrigação e hortaliças no município de Lagoa Seca do Paraíba, obteve resultados de coliformes totais e termotolerantes variando entre $1,30 \times 10^6$ a $1,86 \times 10^6$ e $4,10 \times 10^4$ a $2,78 \times 10^6$ NMP/g.

Bonilha e Falcão (1994) indicaram alto índice de contaminação por coliformes fecais em amostras de água de irrigação e notaram uma redução de microrganismos

nas alfaces enxaguadas das não enxaguadas. Isolaram uma cepa de *E.coli* O:26, a qual demonstrou resistência ao antibiótico novobiocina.

Castro e Valarini (2007), ao avaliarem a água de irrigação e lavagem de alface em cidades localizadas a região noroeste da capital São Paulo, demonstraram que todas as amostras estavam contaminadas por coliformes termotolerantes. Em relação ao cultivo convencional e o cultivo orgânico, o convencional apresentou maiores índices de contaminação.

5.1.3 Pesquisa de *E. coli* diarreiogênicas

Todas as cepas de *E. coli*, foram identificadas através das provas bioquímicas e testadas com soros polivalentes preparados em coelhos para identificação dos sorogrupos de *E. coli* enteroinvasora (EIEC), na presença de soro Polivalente A (contendo anticorpos contra as *E. coli* O:28ac, O:29, O:136, O:144 e O:152) e soro Polivalente B (contendo anticorpos contra as *E. coli* O:112ac, O:124, O:143, O:164 e O:167) e sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica clássica associados à diarreia infantil (EPEC), na presença de soro Polivalente A (contendo anticorpos contra as *E. coli* O:26, O:55, O:111 e O:119), soro Polivalente B (contendo anticorpos contra as *E. coli* O:114, O:125, O:142 e O:158) e soro Polivalente C (contendo anticorpos contra as *E. coli* O:86, O:126, O:127 e O:128).

Foi isolada uma cepa de *E. coli* enteroinvasora (EIEC) de soro Polivalente A. A amostra foi isolada da água da Horta B onde utiliza-se sistema de cultivo no solo para produção de hortaliças, figura 5. A água utilizada é captada de poço semi-artesiano e algumas vezes da rede de abastecimento da cidade.

Tal resultado indica a necessidade de avaliar a procedência deste microrganismo, analisando todas as hipóteses, fornecimento de água, tipo de esterco e fornecedor, condições de saúde dos operários.

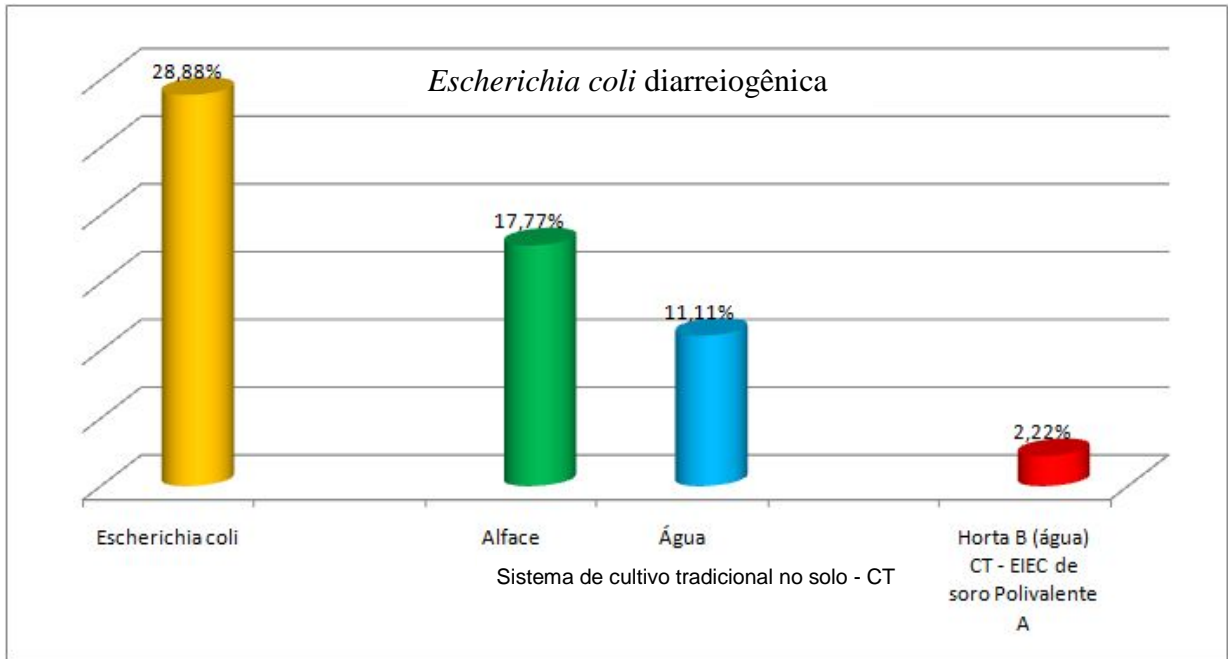


Figura 5 - Representa o percentual de amostras com *E. coli*, comparada com a confirmação de *E. coli* diarréio-gênica.

5.1.4 Análise dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras

5.1.4.1 Análise dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras das amostras de alface

Apesar de não existir padrão para contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras, foram realizadas as contagens na presente pesquisa, porque a presença desses microrganismos em níveis elevados indicam falta de condições higiênico-sanitárias, podendo estar relacionada ao ambiente de produção da matéria-prima, transporte, armazenamento, beneficiamento.

Foi adotado como parâmetro para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras a tolerância de até 10^6 UFC/g, visto que valores acima deste podem indicar: exposição à contaminação ambiente;

permanência por tempo indeterminado sob refrigeração inadequada; armazenamento em temperatura elevada, que são fatores que colaboram para perda da qualidade do produto com provável deterioração, conforme citações em literatura (ALMEIDA, 2006; FRANCO e LANDGRAF, 2003; MORTON, 2001).

Palú et al (2002), ao estudarem hortaliças frescas, sendo 53,3% de amostras de alface, obtiveram resultados elevados para contagens de microrganismos aeróbios mesófilos com valores entre $2,0 \times 10^5$ e $2,7 \times 10^7$ UFC/g.

Todas as amostras analisadas apresentaram crescimento para aeróbios mesófilos, bolores e leveduras. No sistema de cultivo no solo os resultados obtidos para aeróbios mesófilos foram entre $9,0 \times 10^4$ e $4,9 \times 10^5$ UFC/g pertencente à Horta A, $1,5 \times 10^5$ e $8,3 \times 10^6$ UFC/g a Horta B, no cultivo hidropônico entre $5,0 \times 10^4$ e $3,9 \times 10^5$ UFC/g na Horta C, $24,5 \times 10^4$ e $16,5 \times 10^6$ UFC/g e no restaurante entre $13,8 \times 10^2$ e $1,7 \times 10^7$ UFC/g. Quanto aos bolores e leveduras a Horta A mostrou resultados entre $4,3 \times 10^5$ e $3,1 \times 10^6$ UFC/g, a Horta B entre 1×10^5 e $1,6 \times 10^6$ UFC/g, a Horta C entre $2,3 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^6$ UFC/g, a Horta D $2,4 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^6$ UFC/g e no restaurante entre $9,8 \times 10^3$ e $1,4 \times 10^6$ UFC/g.

Nenhuma das hortas e o restaurante deixaram de apresentar contagens de bolores e leveduras acima do parâmetro adotado de 10^6 UFC/g. Os resultados apresentados na tabela 02 demonstram que as Hortas B e D e o restaurante obtiveram valores para contagem de aeróbios mesófilos acima do parâmetro adotado.

Quanto aos microrganismos aeróbios psicotróficos, nenhuma das amostras analisadas apresentou crescimento.

Apesar de 96% das amostras de água e 100% das amostras de alfaces terem apresentado crescimento de microrganismos aeróbios mesófilos, apenas 36% das alfaces apresentaram valores acima de 10^6 UFC/g, sendo um resultado próximo ao encontrado por Souto (2005) que ao analisar água de irrigação e hortaliças no município de Lagoa Seca - PB encontrou valores superiores a 10^7 UFC/g. Resultados semelhantes foram constatados por Paula et al. (2003), ao investigarem níveis de mesófilos totais em alfaces de restaurantes de Niterói – RJ. A presença deste grupo de microrganismos nos alimentos se apresenta como um ótimo indicador da qualidade dos alimentos, uma vez que nos permite inferir sobre o nível de contaminação da matéria-prima, se a limpeza e desinfecção do material são adequadas e se a higiene se faz presente na produção (SIQUEIRA, 1995).

Martins et al. (2008) obtiveram índices elevados para contagem de bactérias mesófilas, maior que 10^7 UFC/g em todas as amostras de alface analisadas na cidade de Bananeiras - PB.

Ao comparar os resultados obtidos nesta pesquisa com as demais citadas anteriormente, notamos a necessidade de tomar providências quanto a melhorias nas condições higiênico - sanitárias.

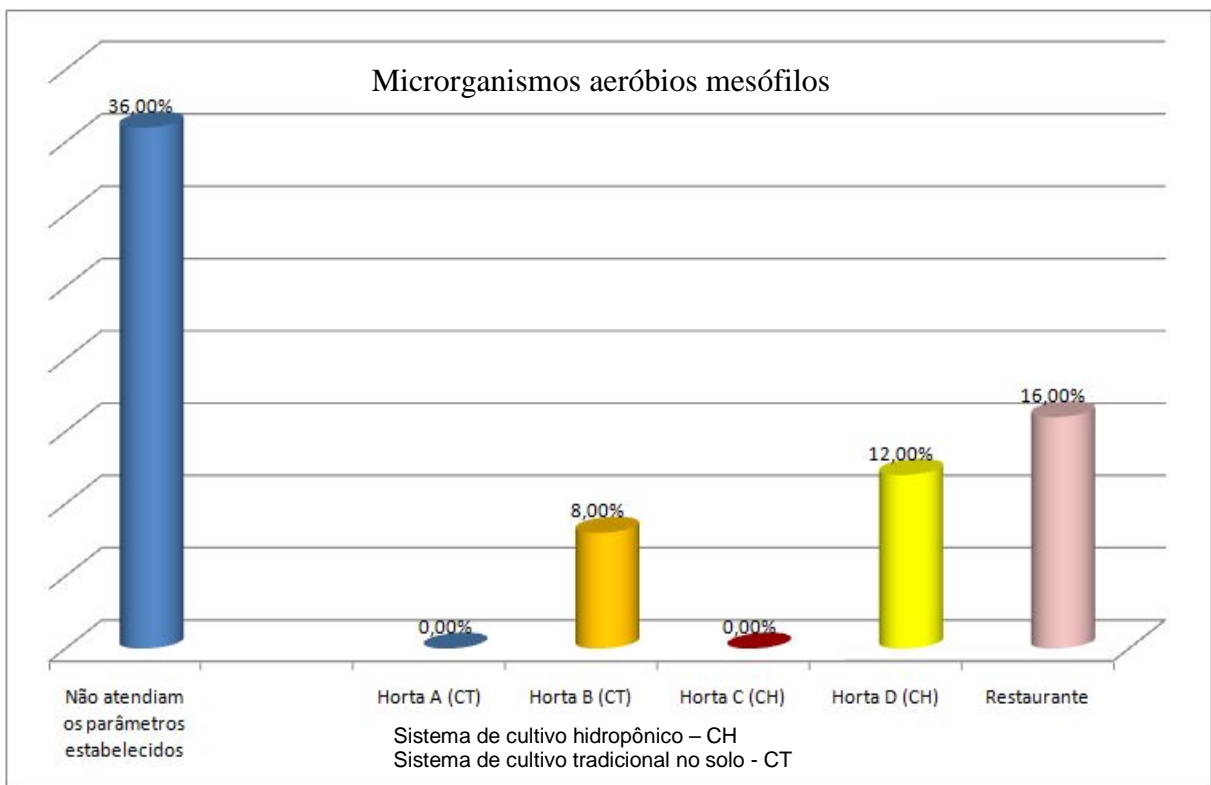


Figura 6 - Representa os resultados da contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos das amostras de alface fora dos parâmetros estabelecidos de 10^6 UFC/g.

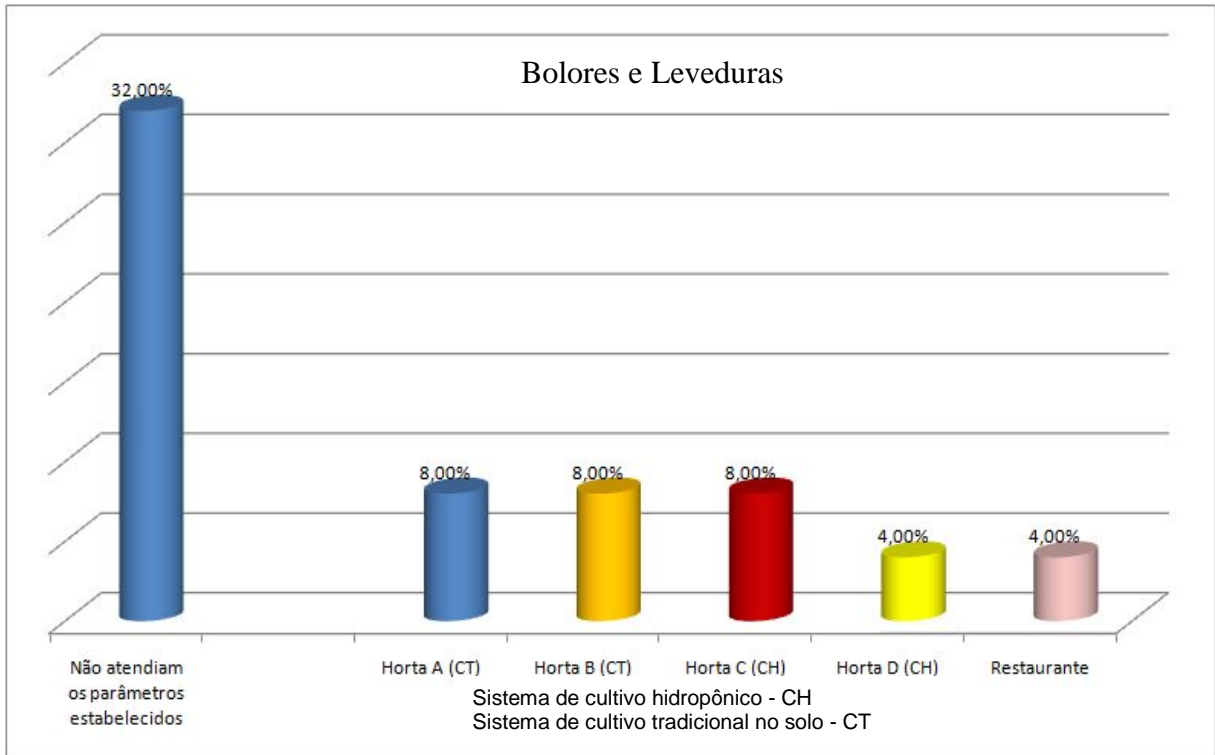


Figura 7 - Representa os resultados da contagem de Bolores e Leveduras das amostras de alface fora dos parâmetros estabelecidos de 10^6 UFC/g.

A leitura das figuras anteriores e da Tabela 03 demonstra a necessidade de melhorias no restaurante quanto às condições higiênico-sanitárias. De acordo com o parâmetro estabelecido para as bactérias heterotróficas, todas as hortas e o restaurante apresentaram condições insatisfatórias de higiene.

5.1.4.2 Análise dos microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras das amostras de água

Os padrões estabelecidos para análise microbiológica da água foram de acordo com a Portaria n°518/2004 (BRASIL, 2004) que determina como limite para microrganismos heterotróficos 500 UFC/ml.

Todas as hortas analisadas apresentaram crescimento para aeróbios mesófilos, bolores e leveduras. Para aeróbios mesófilos a Horta A (CT) apresentou resultados entre $8,1 \times 10^4$ e $3,6 \times 10^5$ UFC/100mL, a Horta B (CT) entre < 10 (ausência de crescimento) e $2,4 \times 10^5$ UFC/100mL, a Horta C (CH) entre $1,0 \times 10^3$ e $1,7 \times 10^4$

UFC/100mL, a Horta D entre $13,7 \times 10^2$ e $2,4 \times 10^4$ UFC/100mL. Quanto aos bolores e leveduras a Horta A expressou os resultados entre $6,6 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^5$ UFC/100mL, a Horta B entre 2×10^2 e $2,4 \times 10^5$ UFC/100mL, a Horta C entre 7×10^2 e $9,7 \times 10^4$ UFC/100mL, Horta D entre 2 e 11 UFC/100mL.

Nenhuma das hortas deixou de apresentar contagens de microrganismos heterotróficos acima do parâmetro estabelecido pela Portaria nº518/2004. A Horta B foi a única a apresentar amostra dentro dos limites permitidos, correspondendo a 4% do total de amostras analisadas. A presente amostra corresponde a mesma mencionada anteriormente coletada no dia 12 de junho, sendo de captação da rede de abastecimento da água da cidade.

Quanto aos microrganismos aeróbios psicrotróficos, nenhuma das amostras analisadas apresentou crescimento.

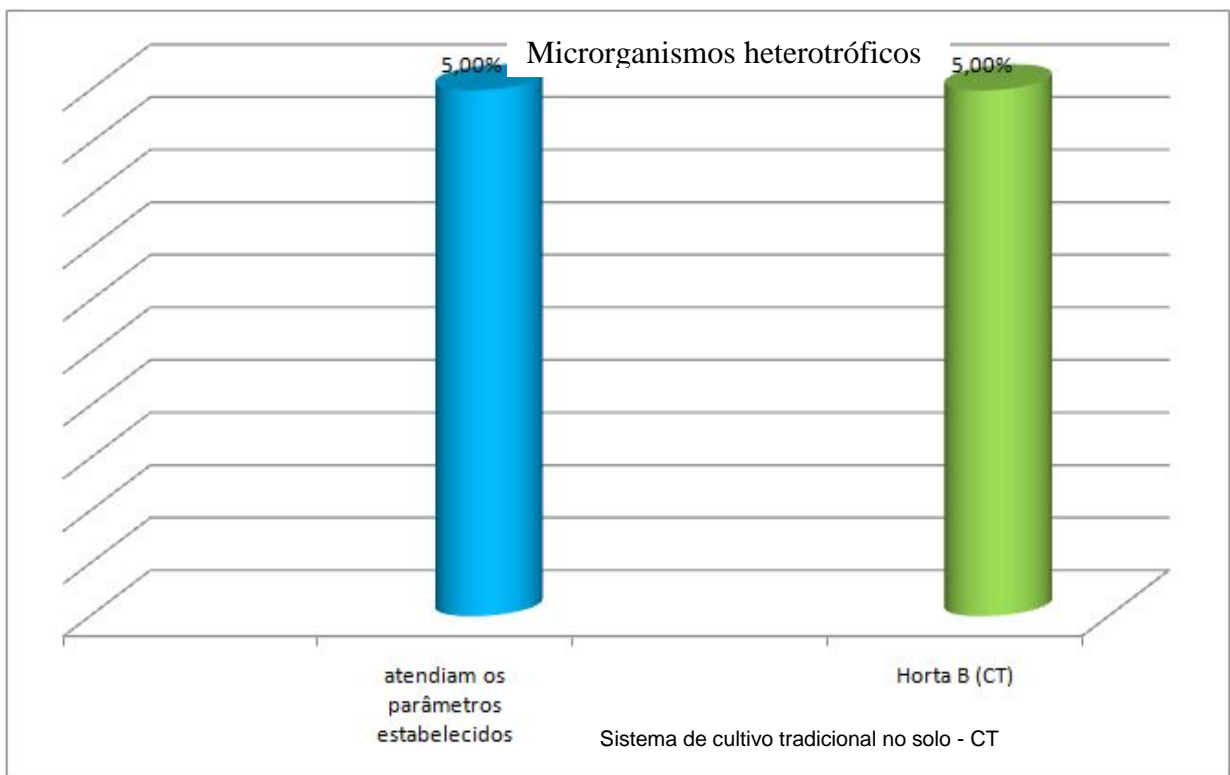


Figura 8 - Representa o percentual de amostras de água com contagem de microrganismos heterotróficos dentro dos parâmetros pela Portaria nº 518/2004.

5.1.5 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Apesar da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* não estar prevista em legislação para hortaliças folhosas “in natura”, foram realizadas as análises microbiológicas de contagem total em placas, de acordo com Silva; Junqueira e Silveira (2001), confirmando as colônias através da coloração de GRAM, catalase e coagulase.

Segundo Berbari; Paschoalino; Silveira (2001) entre as hortaliças mais vendidas para consumo cru está a alface (*Lactuca sativa* L.), bastante utilizada na confecção de sanduíches, decorações de pratos, saladas, etc., além do produto pronto para consumo, na forma de hortaliça minimamente processada, merecendo maiores atenções quanto ao aspecto da saúde pública.

Foi considerada como tolerância a quantidade de microrganismos *Staphylococcus coagulase positiva* 5×10^3 UFC/g o mesmo estabelecido a sanduíches frios e similares, já que não existem padrões destes para alface, conforme ANVISA (BRASIL, 2001).

Índices elevados de *Staphylococcus coagulase positiva* indicam um potencial perigo à saúde pública, devido à possibilidade de produção de enterotoxina. Martins et al. (2008) não detectaram *Staphylococcus coagulase positiva* em todas amostras de alface comercializadas na cidade de Bananeiras - PB, sendo encontradas populações no intervalo de 10^2 - 10^5 , nas demais amostras, resultados estes semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Palú et al. (2002), ao realizarem avaliação microbiológica das frutas e hortaliças de restaurantes tipo *self-service*, onde 15 amostras eram de frutas e 15 amostras de saladas de hortaliças, obtiveram crescimento em 16 (53,3%) das amostras com *Staphylococcus coagulase positiva*, sendo 2 (13,35%) das saladas de hortaliças proveniente da alface, as quais apresentaram cepas produtoras de enterotoxinas, onde uma era produtora de enterotoxina A e a outra de enterotoxina B.

Todas as hortas e o restaurante apresentaram crescimento de *Staphylococcus coagulase positiva*, além de amostras sem crescimento. Desconsiderando a ausência, a Horta A apresentou resultados entre $1,0 \times 10^2$ e $3,5 \times 10^2$ UFC/g, a Horta B entre $1,8 \times 10^2$ e $9,0 \times 10^3$ UFC/g, a Horta C apresentou

crescimento em uma única amostra com resultado de $1,1 \times 10^4$ UFC/g, a Horta D $71,4 \times 10^1$ e $1,5 \times 10^6$ UFC/g e o restaurante em uma única amostra com resultado de $6,0 \times 10^2$ UFC/g.

Obteve-se crescimento para *Staphylococcus* coagulase positiva em 32% (8) das amostras, onde apenas 12% (3) estavam fora do limite estabelecido para pesquisa 5×10^3 UFC/g, sendo cada uma oriunda de uma fonte, Horta B com resultado de $9,0 \times 10^3$ UFC/g, Horta C com valor de $1,1 \times 10^4$ UFC/g e Horta D $1,5 \times 10^6$ UFC/g.

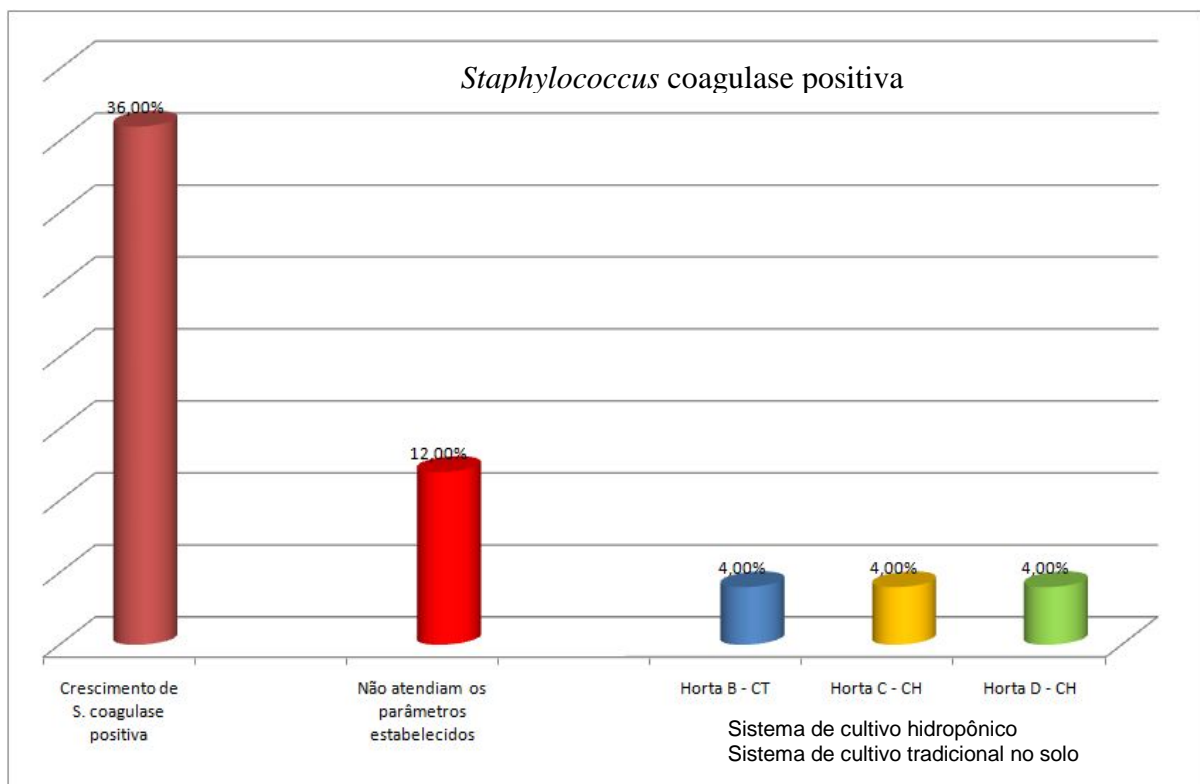


Figura 9 - Percentual de amostra com crescimento para *Staphylococcus* coagulase positiva, comparados conforme os parâmetros estabelecidos de 5×10^3 UFC/g, o mesmo estabelecido a sanduíches frios e similares, de acordo com ANVISA (BRASIL, 2001).

Analisando a Figura 9 verifica-se a necessidade de medidas preventivas de saneamento e orientação aos manipuladores, pois como observado em Palú et al. (2002), podem vir a produzir toxinas, provocando um surto de toxinfecção alimentar.

5.1.6 Determinação de *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp é um dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais. A existência de portadores assintomáticos e a sua permanência no ambiente e alimentos fazem com que assumam um papel de grande relevância na Saúde Pública mundial. Aves e bovinos são responsáveis pela maioria da disseminação desse agente patógeno (SHINOHARA, 2008).

Não houve crescimento de *Salmonella* spp em nenhuma das amostras analisadas, determinando que todas as amostras estavam de acordo com a Resolução da ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece a ausência de *Salmonella* spp em 25g de hortaliças, frescas, “in natura”, inteiras, selecionadas ou não.

Bonilha e Falcão (1994) encontraram *Salmonella* spp em 6% das amostras de água de irrigação e 2% das alfaces lavadas ou não, sendo isolados *S. miami*, *S. bredney* e *S. Abaetetuba*, correlacionando o fato a toxinfecção alimentar ocorrida no mesmo período, na cidade de Araraquara – SP, por *S. miami*.

Palú et al. (2002) em suas análises microbiológicas de frutas e hortaliças, encontraram os resultados: das 15 amostras de saladas com hortaliças frescas servidas em restaurantes do tipo *self-service*, encontraram 4 (26,7%) das saladas cruas fora dos limites estabelecidos pela legislação para *Salmonella* spp, sendo 1 (6,7%) salada de alface.

Takayanagui et al. (2000), ao avaliarem hortaliças em sua maioria alface de 129 hortas do município de Ribeirão Preto-SP, obtiveram 4 hortas com presença de microrganismos patogênicos *Salmonella* spp. Takayanagui et al. (2007), ao analisarem 88 hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto-SP, isolaram uma cepa de *Salmonella panamá*.

Comparando os resultados apresentados nesta pesquisa com os citados, devemos levar em conta que mesmo não observando a presença de *Salmonella* spp, os estabelecimentos devem se adequar a melhorias, pois as contagens para microrganismos heterotróficos foram consideráveis.

5.1.7 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

A metodologia utilizada foi a disco-difusão, devido sua grande flexibilidade na escolha dos antimicrobianos, sua constante padronização metodológica pelo NCCLS (*National Commivtee for Clinical Laboratory Standards*), sua fácil interpretação além de proporcionar resultados qualitativos da sensibilidade, caracterizando os microrganismos testados em sensíveis, intermediários e resistentes às drogas testadas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

A distribuição das cepas de *E.coli* e *S. aureus* isoladas nesta pesquisa, que foram submetidas ao teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, está representada na Tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição numérica e percentual dos microrganismos isolados das hortas e restaurante de municípios da região noroeste do Estado de São Paulo, submetidos a teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Fontes	Natureza do alimento	Nº de amostras	Quantidade de microrganismos isolados	
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphyloccus aureus</i>
Hidroponia	Alface	10 (100)	-	3 (30)
	Água	10 (100)	-	-
Convencional	Alface	10 (100)	6 (60)	5 (50)
	Água	10 (100)	5 (50)	-
Restaurante	Alface	05 (100)	2 (40)	1 (20)
Total		45 (100)	13 (28,89)	8 (17,78)

Legenda: Os números entre parênteses significam percentual; (-) = ausência.

Das 9 cepas de *S. aureus* testadas, 5 (55,55%) apresentaram resistência intermediária a 1 agente antimicrobiano, sendo 3 (33,33%) a cefepime, 1 (11,11%) a eritromicina, 1 (11,11%) a oxacilina e 1 (11,11%) a 2 antimicrobianos (eritromicina/cefepime); 1 (11,11%) foi resistente a 1 antimicrobiano (oxacilina), 3 (33,33%) a 2 antimicrobianos, sendo 1 (11,11%) a (oxacilina/cefepime) e 2 (22,22%) a (penicilina/oxacilina), 3 (33,33%) a 3 antimicrobianos, sendo 2 (22,22%) a (penicilina/oxacilina/tetraciclina) e 1 (11,11%) a (penicilina/oxacilina/cefepime), 1

(11,11%) a 4 antimicrobianos (eritromicina/penicilina/sulfazotrim/tetraciclina) e 1 (11,11%) a 6 antimicrobianos (eritromicina/penicilina/rifampicina/clindamicina/tetraciclina/oxacilina). O maior percentual de resistência foi frente à oxacilina (88,88%), seguido de penicilina (77,77%), tetraciclina (44,44%), cefepime e eritromicina (22,22% cada), sulfazotrim, rifampicina e clindamicina (11,11% cada), conforme apresentado na tabela.

Tabela 6 - Distribuição do percentual do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de hortas e restaurante de municípios da região noroeste do Estado de São Paulo.

Antimicrobianos	Cepas								
	Sensíveis			Resistência Intermediária			Resistentes		
	%			%			%		
	H ^(a)	C ^(b)	R ^(c)	H ^(a)	C ^(b)	R ^(c)	H ^(a)	C ^(b)	R ^(c)
Eritromicina	33,33	80	-	66,67	-	-	-	20	100
Penicilina G	-	-	-	66,67	-	-	33,33	100	100
Oxacilina	-	-	-	-	-	100	100	100	-
Cefepime	-	40	100	66,67	40	-	33,33	20	-
Rifampicina	100	80	100	-	-	-	-	20	-
Cloranfenicol	100	100	100	-	-	-	-	-	-
Clindamicina	100	80	100	-	-	-	-	20	-
Ciprofloxacina	100	100	100	-	-	-	-	-	-
Sulfazotrim	100	100	-	-	-	-	-	-	100
Tetraciclina	100	40	-	-	-	-	-	60	100
Gentamicina	100	100	100	-	-	-	-	-	-

Legenda: ^{1,2,3} = amostras oriundas de hortas por cultivo hidropônico, convencional e de restaurante; ^{(a) / (b) / (c)} = 3, 5 e 1 cepas testadas, respectivamente; (-) = ausência.

Das 13 cepas de *E. coli* testadas 5 (38,46%) apresentaram resistência intermediária a 1 agente antimicrobiano, sendo 4 (30,76%) a cefalotina, 1 (7,69%) a meropenem, 2 (15,38%) a 2 antimicrobianos, sendo 1 (7,69%) a (ampicilina/meropenem) e 1 (7,69%) a (cefalotina/ciprofloxacina), 3 (23,07%) a 3

antimicrobianos, sendo 1 (7,69%) a (cefalotina/ampicilina/meropenem), 1 (7,69%) a (ampicilina/meropenem/ceftazidima), 1 (7,69%) a (cefalotina/meropenem/ciprofloxacina); 4 (30,76%) foi resistente a 1 antimicrobiano, sendo 1 (7,69%) a ceftazidima, 1 (7,69%) a meropenem, 2 (15,38%) a (cefalotina), 5 (38,46%) a 2 antimicrobianos, sendo 1 (7,69%) a (cefalotina/ampicilina) e 4 (30,76%) a (meropenem/ceftazidima). O maior percentual de resistência foi frente à ceftazidima e o meropenem (38,46% cada), seguido de cefalotina (23,07%), ampicilina (7,69%), conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição do percentual do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isolados de hortas e restaurante de municípios da região noroeste do Estado de São Paulo.

Antimicrobianos	Cepas					
	Sensíveis		Resistência Intermediária		Resistentes	
	%		%		%	
	C ^(a)	R ^(b)	C ^(a)	R ^(b)	C ^(a)	R ^(b)
Cefepime	100	100	-	-	-	-
Cefoxitina	100	100	-	-	-	-
Amoxicilina + Clavulanato	100	100	-	-	-	-
Cefuroxima	100	100	-	-	-	-
Cefalotina	18,18	-	63,63	50	18,18	50
Ampicilina	81,82	-	18,18	100	-	-
Meropenem	18,18	50	36,36	-	45,45	50
Ceftazidima	45,45	100	9,09	-	45,45	-
Gentamicina	100	100	-	-	-	-
Ciprofloxacina	81,81	100	18,18	-	-	-
Sulfazotrim	100	100	-	-	-	-
Amicacina	100	100	-	-	-	-

Legenda: ^{1,2} = amostras oriundas de hortas por cultivo convencional e de restaurante; ^(a) / ^(b) = 11 e 1 cepas testadas, respectivamente; (-) = ausência.

Os resultados apresentados acima condizem à conduta do governo junto a RDC 44/2010, para controlar a venda de antibióticos sem receita médica. A cepa

isolada de *E. coli* enteroinvasora (EIEC) de soro polivatente A, apresentou maior sensibilidade aos antimicrobianos frente a outras cepas, expressando como resultado resistência intermediária a cefalotina e resistência ao meropenem.

5.2 ANÁLISE PARASITOLÓGICA

Boa parte do esgoto no Brasil não possui tratamento, falta conscientização sobre os problemas que a água pode ocasionar quando não tratada. Tomando por base as condições sócio-econômicas e a expansão demográfica, a mudança dos hábitos alimentares da população na atualidade, observa-se um aumento no consumo de hortaliças. Apesar de todo desenvolvimento tecnológico da agricultura e técnicas melhoradas de cultivo, a maioria dos horticultores trabalham com sistema tradicional de cultivo no solo, utilizando água em condições inadequadas na irrigação, adubos provenientes de fezes animais sem procedência, podendo conter bactérias multi-resistentes e parasitas patogênicos ao homem. Portanto as hortaliças são problema de saúde pública estando envolvidas em várias doenças transmitidas pelos alimentos, havendo a necessidade de melhor fiscalização e orientação no setor hortifrutigranjeiro.

Os vegetais que crescem em solos poluídos podem carrear ovos de helmintos parasitas de humanos, principalmente *Ascaris* e *Trichuris*, mais resistentes às condições externas e que não requerem hospedeiros intermediários (RUDOLFS, FALK; RAZOTZKIE, 1951)

Marzochi (1977) estudou os fatores de disseminação de enteroparasitas, analisando verduras e solo nas hortas de Ribeirão Preto – SP, encontrando protozoários (cisto de *Giardia* sp, *Entamoeba* sp, etc.) e helmintos (*Ascaris* sp, *Ancylostomidae*, *Enterobios* sp, etc). As análises decorreram em dois períodos, chuvoso e seco, demonstrando aumento de enteroparasitas com a necessidade do sistema de irrigação, comprovando que a contaminação se dá pela água contaminada.

Tabela 8 - Análises parasitológicas das amostras de alface (*Lactuca sativa*)

Fonte	Resultado	Parasitas encontrados			
		Paramécios (amebas de vida livre)	Larva de vida livre	<i>Strongylóides stercolaris</i>	<i>Entamoeba coli</i>
Horta A					
1 ^a	positivo	presença	ausência	presença	ausência
2 ^a	positivo	presença	presença	ausência	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência	presença	ausência
4 ^a	positivo	presença	presença	ausência	ausência
5 ^a	positivo	presença	ausência	presença	ausência
Horta B					
1 ^a	positivo	presença	presença	ausência	ausência
2 ^a	positivo	presença	presença	ausência	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência	presença	ausência
4 ^a	positivo	presença	presença	ausência	ausência
5 ^a	positivo	presença	ausência	presença	ausência
Horta C					
1 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
2 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
4 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
5 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
Horta D					
1 ^a	positivo	presença	presença	ausência	ausência
2 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	presença
4 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
5 ^a	negativo	ausência	ausência	ausência	ausência
Restaurante					
1 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
2 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
4 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência
5 ^a	positivo	presença	ausência	ausência	ausência

Legenda: Horta A e B cultivo tradicional no solo; Horta C e D cultivo hidropônico.

Mota et al. (1983) verificaram altos níveis de enteroparasitas em hortaliças consumidas cruas na cidade de Curitiba, Paraná.

Guilherme et. al. (1999) analisaram hortaliça da feira do produtor em Maringá - PR, encontrando alto índice de enteroparasitas, comparando os resultados das

hortaliças com os resultados dos exames realizados dos vendedores e produtores, não evidenciando coerência entre os parasitas identificados.

Tabela 9 - Análises parasitológicas das amostras da água de lavagem das hortaliças.

Fonte	Resultado	Parasitas encontrados	
		Paramécios (amebas de vida livre)	Larva de vida livre
Horta A			
1 ^a	positivo	presença	ausência
2 ^a	positivo	presença	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência
4 ^a	positivo	presença	ausência
5 ^a	positivo	presença	ausência
Horta B			
1 ^a	positivo	presença	ausência
2 ^a	positivo	presença	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência
4 ^a	negativo	ausência	ausência
5 ^a	positivo	presença	ausência
Horta C			
1 ^a	positivo	presença	ausência
2 ^a	positivo	presença	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência
4 ^a	positivo	presença	ausência
5 ^a	positivo	presença	ausência
Horta D			
1 ^a	positivo	presença	ausência
2 ^a	positivo	presença	ausência
3 ^a	positivo	presença	ausência
4 ^a	negativo	ausência	ausência
5 ^a	negativo	ausência	ausência

Legenda: Horta A e B cultivo tradicional no solo; Horta C e D cultivo hidropônico.

Os exames parasitológicos das verduras analisadas por Takayanagui et al. (2000) em hortas do município de Ribeirão Preto-SP apresentaram contaminação por vários enteroparasitas patogênicos ao homem como *Ascaris* sp, *Giardia* sp, *Strongyloides* sp e *Hymenolepis nana*.

Takayanagui et al. (2007), após implantação de sistema de fiscalização das hortas em Ribeirão Preto-SP, analisaram hortaliças e água de 89 hortas, sendo detectados simultaneamente, parasitas considerados patogênicos ao homem em 14,6% das hortaliças pesquisadas e 17 % das águas analisadas.

Os resultados das análises parasitológicas nesta pesquisa representadas nas Tabelas 06 e 07, quanto à presença de parasitas patógenos ao homem, estão bem abaixo dos índices encontrados nos estudos citados. Na alface, 20% das amostras apresentaram contaminação por *Strongyloides stercoralis* e 4% por *Entamoeba coli*, enquanto que em 76% não foi detectado nenhum parasita patogênico ao homem.

Em nenhuma das amostras de água foi detectada a presença de parasitas patogênicos ao homem.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados das análises demonstram as condições higiênico-sanitárias dos locais de produção das hortaliças e no prato do consumidor ao comparar a alface de mesmo lote fornecida pela Horta D ao restaurante, permitindo verificar a possibilidade de ocorrência de contaminação de transporte e manuseio no restaurante, bem como a eficácia das técnicas de sanitização e armazenamento.

As análises foram realizadas em alface (*Lactuca sativa*) de sistema de cultivo tradicional no solo nas Hortas A e B e de cultivo hidropônico nas Hortas C e D. Correlacionando os microrganismos pesquisados a Horta A apresentou índices mais baixos que a Horta B, seguidos das Hortas D e C, porém o restaurante apresentou índices mais elevados que o da Horta D.

Ao comparar todas as amostras analisadas de cada horta, incluindo o restaurante, as do sistema de hidroponia apresentaram melhores condições

higiênico-sanitárias, sendo as únicas a não apresentarem crescimento de coliformes termotolerantes, apesar da Horta D ter apresentado o índice mais elevado de *Staphylococcus* coagulase positiva $1,5 \times 10^6$ UFC/g.

Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* spp em 25g de hortaliças, estando de acordo com a Resolução do ANVISA (BRASIL, 2001).

Foram encontrados parasitas de vida livre em todos os estabelecimentos, porém a Horta D foi a única a apresentar amostra de água e alface sem a presença de parasitas. Parasitas patogênicos ao homem foram encontrados apenas nas amostras de alface sendo todas de cultivo tradicional no solo.

Nas análises da água de lavagem das hortaliças, todas as hortas apresentaram elevados índices de coliformes totais, aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, exceto a Horta D com valores de bolores e leveduras variando entre $< 10^{\text{est}}$ a 11 UFC/g. As Hortas C e D foram as únicas que não apresentaram crescimento de coliformes termotolerantes, comprovando que o sistema de hidroponia apresenta melhores condições higiênico-sanitárias na referente pesquisa que as de cultivo tradicional. Ao contrário do ocorrido nas amostras de alface, a Horta B apresentou índices mais baixos do que a Horta A, para os microrganismos pesquisados, porém na Horta B se isolou a *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) de soro Polivalente A.

Portanto a referente pesquisa comprova que microrganismos causadores de toxinfecções alimentares podem ser provenientes do local de produção da matéria-prima como é o caso da *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) de soro Polivalente A. Os *Staphylococcus* coagulase positiva podem ser produtores de enterotoxinas, os bolores e leveduras podem produzir micotoxinas e os índices elevados de microrganismos heterotróficos condizem com a possibilidade de crescimento de mais microrganismos patogênicos entéricos, havendo então a necessidade de melhorias no sistema de manejo desses hortifrutigranjeiros, através de cursos de capacitação para os produtores, bem como um sistema melhor de fiscalização pelos órgãos competentes.

Os microrganismos isolados apesar de serem possíveis causadores de toxinfecções alimentares, não pertencem ao gênero encontrado pela ANVISA, nos últimos cinco anos que tiveram ocorrência de salmonelose nos municípios de Meridiano, Fernandópolis e Jales, conforme dados fornecidos pelo Grupo de Vigilância Sanitária xxx Jales.

As cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Escherichia coli* isoladas e submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, apresentaram cepas com resistência intermediária e resistentes a vários antimicrobianos, fazendo valer a RDC 44/2010 que restringe a venda de antibióticos sem prescrição médica. Contudo devem-se intensificar as fiscalizações quanto às fábricas de ração animal e uso veterinário, pois podem contribuir diretamente a existência de cepas resistentes.

Analisando os resultados da Horta D com os obtidos no restaurante, podemos afirmar que nesta pesquisa a toxinfecções alimentares estão mais relacionadas ao manuseio no processamento e conservação dos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENAINEM, R. **New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables.** Trends in Food Science & Technology, v.7, n. 6, 1996, p.179-187.

ALMEIDA, M. T. T. **Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes *self-service* no Município de Limeira – SP.** 2006. 92 f. Tese (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

ALMEIDA, P. C. de F. **Avaliação das condições ambientais e higiênico-sanitárias na produção de hortaliças Folhosas no núcleo hortícola suburbano de Vargem Bonita, Distrito Federal.** 2008. 103 f. Tese (mestrado) – Universidade Católica de Brasília.

AMARO, D. X.; ALMEIDA, A. B.; SOUZA, J. M. de; PÓVOA, H.; ARÊDES, E. M. **Avaliação da qualidade microbiológica de alface e agrião comercializado no município de Muriaé-MG.** Revista científica da FAMINAS – Muriaé – v.2, n.1, sup.1, p.27, jan.-abr., 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 17.ed. Washington, 1992. 619 p.

ANDRIOLO, J. L.; ESPINDOLA, M. C.; STEFANELLO, M. O. **Crescimento e desenvolvimento de plantas de alface provenientes de mudas com diferentes idades fisiológicas.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.1, Jan-Fev, p.35-40, 2003.

ARBOS, K. A. **Qualidade sanitaria e nutricional de hortícolas orgânicas.** 2009. 161 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná.

ARCHIBALD, E. M. **Watershed sanitary survey of the California State Water Project.** Water Suplly, vol.12, n.1-2, p.9-12, 1994.

ARRUDA, G. A.; POPOLIM, W. D.; FUJINO, H.; LEITE, C. L.; RIBEIRO, L. C. **Avaliação das condições de entrega de gêneros perecíveis em Unidade de Alimentação e Nutrição, através do método de Análises de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC).** Hig. Aliment. 44(10): 44-8, 1996.

ASSIS, R. L. de; AREZZO, D. C. de; ALMEIDA, D. L. de; DE-POLLI, H. **Aspectos Sócio- Econômicos da Agricultura Orgânica Fluminense.** *Revista de Administração Pública*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 26-42, 1996.

ASSIS, R. L. de; AREZZO, D. C. de; DE-POLLI, H. **Consumo de Produtos da Agricultura orgânica no Estado do Rio de Janeiro.** *Revista de Administração*, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 84-89, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Coletânea de Normas e Planos de Amostragem**, v.2, b1-50, 1985.

BARROS, A. J. M.; CEBALLOS, B. S. O.; KONIG, A.; GHEYI, H. R. **Avaliação sanitária e físico-química das águas para irrigação de hortaliças no Agreste e Brejo paraibanos.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.3, n.3, p.335-360, 1999.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. **Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada.** *Ciênc.Tecnol. Alim. Campinas*, v. 21, n. 2, p. 197-201, maio-ago. 2001.

BLAHA, T. **Epidemiology and quality assurance application to food safety.** *Preventive Veterinary Medicine*, 39, p.81-92, 1999.

BLANCO, M. C. S. G.; GROPPPO, G. A.; TESSARIOLI NETO, J. 1997. **Alface (*Lactuca sativa* L.).** *Manual Técnico das Culturas* 2(8): 13-18.

BLUMENTHAL, U. J.; MARA, D. D.; PEASEY, A.; RUIZ PALACIUS, G.; STOTT, R. **Redução dos riscos para a saúde com a utilização agrícola de águas residuais: mudanças recomendadas nas pautas da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS.** *Agricultura Urbana*. Disponível em: <http://www.agriculturaurbana.org.br>
Acesso em: 10 ab. 2009.

BONILHA, P. R. M. **Comparação das condições sanitárias das alfaces cultivadas e comercializadas na cidade de Araraquara – SP,** *Alim. Nutr.*, São Paulo, v.4, p.125-131, 1992.

BONILHA, P. R. M. **Microorganismos indicadores de contaminação fecal e enteropatôgenicos em hortaliças e suas águas de irrigação.** 1986. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

BONILHA, P. R. M.; FALCÃO, D. P. **Occurrence of enteropathogens on lettuce and its irrigation water.** Alim. Nutr., São Paulo, v.5, p.87-97, 1994

BRACKETT, R. E. **Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce.** *Postharvest Biology and Technology*. V.15, p.305-311, 1999.

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

BRACKETT, R. E.; SUNDLEWOOD, D. M.; FLETCHER, S. M.; HORTON, D. I. **Food Safety: Critical points within the production and distribution systems.** P.301-306. In: Shewfelt, R.L & Prussia, S. E (eds.). *Postharvest handling: a systems approach*. San Diego: Academic press, 1993. p. 301-302.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997.** Dispõe sobre regulamento técnico sobre princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: [HTTP://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php](http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php). Acesso em 17 de maio de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. **Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001.** Dispõe sobre regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Disponível em: [HTTP://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm). Acesso em: 20 mar. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 518, de março de 2004.** Dispõe sobre padrões microbiológicos e físico-químicos da água e a responsabilidade deste controle sendo do fornecedor sob fiscalização de instâncias governamental, as quais cabem a missão de garantir a “vigilância da qualidade da água para consumo humano”. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf Acesso em 10 de outubro de 2009.

BRECHT, J. K. **Physiology of lightly processed fruits and vegetables.** *HortScience*, Alexandria, v.30,n.1, 1995,p.18-22.

BRYAN, F. L. **Aplicação do Método de Análises de Riscos Por pontos Críticos de Controle em Cozinhas Industriais.** *Hig. Aliment.* 25(7): 15-22, 1993.

CANTWELL, M. **Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables**. In: Kader, A. A. (Org.). *Postharvest technology of horticultura crops*. 2 ed. Davies, 1992, p.277-281.

CASTELLANE, P. D.; ARAÚJO, J. A. C. **Cultivo sem solo: hidroponia**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994. 43p.

CASTRO, L. M.; VALARINI, P. J. **Avaliação da contaminação de coliformes fecais em alface (*Lactuca sativa*), água de irrigação e lavagem em sistemas de produção orgânica e convencional**. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.2, n.2, out. 2007.

CHRISTOVÃO, D. de A. **Relatividade do significado do índice coliforme e proposição de índice corrigido**. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 11(1):89-96, jun. 1957.

CHRISTOVÃO, D. de A.; LARIA, S. T.; CANDEIAS, J. A. N.; **Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de São Paulo**. *Rev. Saúde públ., São Paulo*, 1 (1): 3-11, jun. 1967.

CLSI publication M100-S20 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Repeating on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2010.

COLI, M. C. M.; PEREZ, M. A. B.; FREITAS, R. M. **Avaliação das inspeções sanitárias por APPCC em estabelecimentos de alimentos no município de Belo Horizonte, após um ano de implantação**. XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, 15-17 de julho de 1998.

COSTA, M. C.; PATRICK, A.; RUBIN, A.; OLIVEIRA, A. S.; PANGARO, C.; MOITINHO, C.; MENDONÇA, D.; VIEIRA, F.; JOSÉ, F.; WILSON, P. **Doenças parasitárias**. *Parasitology llnes*, v.28, p. 113-116, 2001

DAROLT, M. R. **A qualidade nutricional do alimento orgânico é superior ao convencional?** IAPAR-SC. 2003. 4p.

DIAS, R. **Verminose no Brasil**. 2002. Disponível em: <http://www.verminose.com.br.html>. Acesso em: 20 mar. 2009.

EIROA, M. N. U. **Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causada por alimentos processados.** Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.19, n.2, p.101-112, 1989.

ENGINDENIZ, S.; TUZEL, Y. **Economic analysis of organic greenhouse lettuce production in Turkey.** *Scientia Agricola*. Piracicaba, v.63, n.3, p.285-290, May./June. 2006.

EVERS, B. **Foodborne safety and infection.** Food Chemical News, v.6, n.9, 1996.

FAO. Codex alimentarius. **Código de procedimentos de higiene para estabelecimentos onde são servidos alimentos pré-cozidos e cozidos em alimentação para coletividade.** In: Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas. 2ª ed. São Paulo, 1995.

FAQUIN, V.; FURTINI Neto, A. E.; VILELA, L. A. A. **Produção de alface em hidroponia.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 50p.

FEIDEN, A. **Conversão de Sistemas de Produção Convencionais para Sistemas de Produção Orgânicos.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2001. 20p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 139).

FILGUEIRA, F. A. R. **Asteráceas - alface e outras hortaliças herbáceas.** In: **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV, 2000. v.1, p.289-295.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M.; Destro, M. T. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.p27-171.

FURLANI, P. R. 1996. **Hidroponia.** Instituto Agrônomo de Campinas, Boletim Técnico. 100: 1-277.

FURLANI, P. R.; BOLONHEZI, D.; SILVEIRA, L. C. P.; FAQUIN, V. **Nutrição mineral de hortaliças, preparo e manejo de soluções nutritivas.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.20, n.200/201, p.90-98, 1999.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L.; KAMEI, C. A. K.; SILVA, K. C.; LAMARDO, L. C. A.; ROCHA, M. F. G.; VIEIRA, V. K. I.; KAWASAKI, v. m. **Manipuladores de Alimentos: Capacitar? E preciso. Regular? Será preciso?** Higiene Alimentar. V.14, n.78/79. Nov./Dez., 2000.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene Vigilância Sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. 655p.

GONÇALVES, P. M. R. **Toxinfecções alimentares** - Uma revisão. Higiene Alimentar, Vol. 12, nº 53, 1998.

GRABOW, W. **Waterborne diseases: update on water quality assessment and control**. *Water S. A.*, v.22, p.193-202, 1996.

GUADAGNIN, S. G.; RATH, S.; REYES, F. G. R. **Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems**. *Food Additives and Contaminants*, London, v. 22, n. 12, p. 1203-1208, 2005.

GUILHERME, A. L. F.; ARAUJO, S. M. de; FALAVIGNA, D. L M.; PUPULIM, A. R. T.; DIAS, M. L. G. G.; OLIVEIRA, H. S. de; MAROCO, E.; FUKUSHIGUE, Y. **Prevalência de enteroparasitas em horticultores, hortaliças da feira do produtor em Maringá - PR**, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, p.405-411, jul-ago, 1999.

HAMERSCHIMIDT, I. **Agricultura orgânica: Conceituações e princípios**. *In: Anais do 38º Congresso Brasileiro de Olericultura*. Petrolina-PE; ART&MIDIA, 1998. CD-ROM.

HIDROGOOD. 2007. **Sobre hidroponia**. Disponível: <http://www.hidrogood.com.br> Acesso em: 15 abr. 2010.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999.

IBGE. Censo Agropecuário: Brasil, 1996. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=1>. Acesso em 24 ago.2009.

ICMS/IAMS –APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 1997.

INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods 1: their significance and methods of enumeracion**. Toronto: University of Toronto Press, 2.ed., 1978. 434p.

ISSAC-MARQUES, A. P.; LEZAMA-DAVILA, C. M.; KU-PECH, R. P.; TAMAY-SEGOVIA, P. **Calidad sanitária de los suministros de água para consumo humano em Campeche**. *Salud Publica*, Cidade do México, v.36, n.6, p.55-61, 1994.

JACKSON, L.; MAYBERRY, K.; LAEMMLEN, F.; KOIKE, S.; SCHLUBACK, K. **Iceberg lettuce production in California**. Disponível em <<http://www.commserv.ucdavis.edu/freepub/>>. Acesso em jan. 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Tradução de E. C. Tondo et al. 6.Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JORNAL DO BRASIL, Rio de Janeiro, 21 jun. 1997, 1º caderno, p.17.

JUNQUEIRA, A. H. **Hortaliças, novos caminhos no ambiente protegido**. *AGRIANUAL 99 - Anuário da Agricultura Brasileira*. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 1999. p. 35-38.

KNOTT, J. E. **Handbook for vegetable growers**. 2, ed. New York: John Wiley e Sons, 1962. 245 p.

LABHIDRO. 2006. **A hidroponia na Segunda Guerra**. Disponível em: <http://www.labhidro.cca.ufsc.br>. Acesso em 06 jun. 2010.

LEITÃO, M. F. de F. **O controle microbiológico na avaliação da qualidade de alimentos**. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.15, n.3, p.253-277, 1981.

LIMA, J. S. **Bioindicação em ecossistemas terrestres**, Disponível em: <http://www.techoje.com.br/site/techoje/categoria/detalhe_artigo/173>. Acesso em: 20 out. 2009.

LIMA, V. L. A.; MELO, E. de A.; SENA, E. N. **Condições higiênico-sanitárias de fast food e restaurantes da região metropolitana da cidade do Recife-PE**. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.12, n.57, p.50-53, 1998.

LIRA, A. A.; BARROS, G. C.; LIMA, E. T.; SILVA, L. B. G. **Correlação entre a patogenicidade de *Escherichia coli* e doenças de origem hídrica.** Hig. Aliment., v. 15 n.85, p.57-60, jun. 2001

LONDERO, F. A. A.; AITA, A. **Comercialização de alface hidropônica.** In: **SANTOS, O. Hidroponia da Alface.** Santa Maria : UFSM, 2000. p.145-152.

MACHADO, I. C.; PAULA, A. M. R.; BUZZO, A.; JAKABI, M.; RISTORI, C.; SAKUMA, H. **Estudo da ocorrência de contaminação orgânica na estuário da Cananéia, como subsídio para extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliana*). Análise da ostra (tecidos moles e líquido intervalar),** 2. Hig. Aliment., v15, n.83, p.44-48, abr. 2001

MARTH, E. H. **Salmonellae and salmonellosis associated with milk and milk products: a review.** Journal of Dairy Science, v.52, n.3, p.283-315, Mar. 1969.

MARTINS, A. C. A.; SILVA, L. A. da; SANTOS, J. G. dos; ANDRADE, L. F. de; MARTINS, L. P. **Avaliação da qualidade microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) comercializada na cidade de Bananeiras - PB,** III Jornada Nacional da Agroindústria, agost. 2008, ISSN 1980-1122.

MARZOCHI, M. C. de A. **Estudo envolvidos na disseminação dos enteroparasitas. II – Estudos da contaminação de verduras e solo de hortas na cidade de Riberão Preto, São Paulo, Brasil.** Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, v. 19, p. 148-155, maio-junho, 1977.

MENEZES, N. L.; SANTOS, O. S.; SCHMIDT D. 2001. **Produção de sementes de alface em cultivo hidropônico.** Ciência Rural 31(4): 705-706.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica.** São Paulo: Editora Monole. 1999, ed.2, 584p.

MIYAZAWA, M., KHATOUNIAN, C. A.; ODENATH-PENHA, L. A. **Teor de nitrato nas folhas de Alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico.** Agroecologia Hoje. Ano II. N. 7, Fev./Mar. 2001, p.23.

MOGHARBEL, A. D. I.; MASSON, M. L. **Perigos associados ao consumo da alface, (*Lactuca sativa*),** IN NATURA Alim. Nutr., Araraquara, v. 16, n. 1, p. 83-88, jan./mar. 2005.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap.7, p.63-67.

MOSSEL, D. A. A.; JANSEN, J. T.; STRUIJK, C. B. **Microbiological safety assurance applied to smaller catering operations world-wide**. Food Control. V.10, p.195-211, 1999.

MOTA, C. C. S.; ELIAS, A.; MIKOSZEWSKA, I.; VIEIRA, H. R. A.; PICHET, NETO J.; VASQUES, R. M. R.; ALMEIDA, A.; GAISSLER, M. S.; BEATRIZ, R.; MOTA, R. M. T. C. S. **Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas em Curitiba, PR.** (Brasil). In: Programa e Resumos do VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Brasília p.125, 1983.

NASCIMENTO, M. S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. 2002. 115f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2002.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M. **Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, comercializadas no município de Campinas-SP**. Higiene Alimentar, v.17, n.114-115, p.73-76, 2003.

NETO, A. J. S.; ZOLNIER, S. **Preparo e manejo de soluções nutritivas para cultivos hidropônicos e em substratos**. Revista Plasticultura, Campinas – SP, ano III, n.12, p.16-17, 2010

NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; VICTOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**, 11. ed., São Paulo, editora Atheneu, 2005.

OHSE, S.; NETO, D. D.; MARFROM, P. A.; **Qualidade de cultivares de Alface produzidos em hidroponia**. Sci. agri. vol.58 n.1 Piracicaba Jan./Marc., 2001.

OLIVEIRA, C. A. A.; VALENTE, D. **Verificação dos principais locais onde são adquiridos ou consumidos alimentos no município de Ribeirão Preto, SP**. VI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, Guarapari, ES. 2000.

OLIVEIRA, C.A.F. de; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. **Enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo**. Higiene Alimentar, v.22, n.6, p.34-36, junho, 1992.

OLIVEIRA, C.A.F. de; GERMANO, P.M.L. **Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP**, Brasil. I – Pesquisas de helmintos. *Revista de Saúde Pública*, v.26, n.4, p. 283-289, agosto, 1992, a.

OLIVEIRA, C.A.F. de; GERMANO, P.M.L. **Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP**, Brasil. II – Pesquisas de protozoários intestinais. *Revistas de Saúde Pública*, v.26, n.4, p. 332-335, agosto, 1992, b.

OLIVEIRA, M. L. S. et al. **Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.) e tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará**. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.20, n.143, p.96-101, 2006.

PAIVA, M. C. **Produção de hortaliças em ambiente protegido**. Cuiabá: Sebrae-MT, 1998.78p.

PALÚ, A. P.; TIBANA, A.; TEIXEIRA, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; PYRRHO, A. dos S.; LOPES, H. R. **Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças, servidas em restaurantes self-service privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro**. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.6, n.100, p. 67-74, set. 2002

PAULA, P.; RODRIGUES, P. S. S.; TÓRTORA, J. C. O.; UCHÔA, C. M. A.; FARAGE, S. **Contaminação microbiológica e parasitologia em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, Niterói, RJ**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.36, n.4, p.535-537, 2003.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: McGraw-Hill. 1997, v.2, 565p.

Pernambuco. Secretaria de Saúde do Estado. **Código Sanitário**. Decreto 20786. Recife, 1998.

PESAGRO Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro. **Documentos: alface, *lactuca sativa* L.; cultivo, tecnologia, produção, aspecto econômico**. Rio de Janeiro: Coordenadoria de Difusão de Tecnologia, 2001

REGO, J. C.; GUERRA, N. B.; PIRES. **Influência do Treinamento no Controle Higiénico-sanitário de Unidades de Alimentação e Nutrição**. *Revista de Nutrição da PUCCAMP*, campinas, v.10, n.1, jan.-jun., 1997.

RESH, H.M. **Cultivos hidropônicos; nuevas técnicas de producción** 4.ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1997. 553p.

RODRIGUES, E. T. **Efeito das adubações orgânica e mineral sobre o acúmulo de nutrientes e sob o crescimento da alface (*Lactuca sativa*.)**. 1990, 60 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa - MG.

RODRIGUES, L.R.F. 2002. **Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido**. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, 762 p.

ROLLE, R. S., CHISM III, G. W. **Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables**. Journal of Food Quality, Connecticut, v.10, n.3, 1987, p.157-177.

RUDOLFS, W.; FALK, L.L.; RAZOTZKIE, R. A. **Contamination of vegetables grow in polluted soil. III - Field studies on *Ascaris* eggs**. Sewages industrialized and Wastes 23:656-660, 1951.

SAMINEZ, T. C. O; VIEIRA, R. C. M. **Agricultura Orgânica: Instrumento para a Sustentabilidade dos Sistemas de Produção e Valoração de Produtos Agropecuários**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 22p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 122)

SANTOS, O. S. **Conceito, histórico e vantagens da hidroponia**. In: SANTOS, O. Hidroponia da alface. Santa Maria : UFSM, 2000. p.5-9.

SÃO PAULO. **RESOLUÇÃO SS-196 de 29/12/1998**. Padroniza os roteiros e guias de inspeção em anexo produzidos pelo CVS. Diário Oficial do Estado de São Paulo. São Paulo, v.108, n.248, 31 de dezembro de 1998.

SCANDOLERA, A. J.; PALHARES, J.C.; LUCAS, J. de.; AMARAL, A. do.; MENDONÇA, R. P. de.; OLIVEIRA, G. P. de. **Analyze chemistry, microbiological and parasitological of the drinking water in UNESP and wastewater from Jaboticabal – SP**. Ci. Agrárias, Londrina, v.22, n.1, p. 83-91, jan./jun. 2001

SEGOVIA, O. F. J.; ANDRIOLO, L. J.; BURIOL, A. G.; SCHNEIDER, M. F. **Comparação do crescimento e desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) no interior e no exterior de uma estufa de polietileno em Santa Maria, RS**. Ciência Rural, Santa Maria, v.27, n.1, p.37-41, 1997.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: UNICAMP, 1987. 387p.

SHEWFELT, R. L.; HEATON, E.K.; BATAL, K. M. **Non destructive color measurement of fresh broccoli**. Journal of Food Science, Chicago, v.49, n.8, p.1612, 1987.

SHINOHARA, N. K.S.; BARROS, V. B. de; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. de C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA, J. L. de. **Salmonella spp, importante agente patogênico veiculado em alimentos**. Rev. Ciência & Saúde Coletiva, v.13, n.5, Rio de Janeiro, set.-out. 2008.

SILVA Jr, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. São Paulo, Livraria Varela 2ª edição, 1996.

SILVA JR. **Journal of Food Protection**, v. 62, n11, p. 1278-1284, 1999.

SILVA JR., E. A. S. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. 4ª ed., São Paulo, Varela, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, A. F. N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo, Livraria Varela, 2001 2ª Edição, 2001.

SILVA, W. P. da.; GANDRA, E. A. **Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos**. Higiene Alimentar, São Paulo: v.18, n.122, p. 33-35, jul. 2004.

SIQUEIRA, I.M.C.; MOURA, W.L.M. **Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da Grande Belo Horizonte**. Higiene Alimentar; v.49, n.11, p.36-39, maio-jun. 1997.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EBRAPA, CTAA, 1995. 159p.

SKURA, B. J.; POWRIE, W. D. **Modified atmosphere packing of fruits and vegetables**. Vegetable Processing. New York: VCH Publishers, 1995, 279p.

SOARES, B.; CANTOS, G. A. **Avaliação microbiológica de alface (*Lactuca sativa*) comercializada em Florianópolis - Santa Catarina**, em relação à presença de coliformes totais e fecais. Revista Higiene Alimentar. São Paulo, v. 20, n. 147, dez. 2006.

SOUTO, R. A. de. **Avaliação sanitária das águas de irrigação e de alfaces (*Lactuca sativa*, L.) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraíba.

SOUZA, R. M. G. L.; PERRONE, M. A. **Padrões de potabilidade da água**. 12p. Disponível em: <http://cvs.sal.sp.gov.br/pvol2.html>. Acesso em : 12 ago. 2009.

TAKAYANAGUI, O. M.; CAPUANO, C. A. D.; OLIVEIRA, A. M.; BERGAMINI, M. H. T.; OKINO, A. A. M. C.; CASTRO E SILVA, M. A. O.; RIBEIRO, E. G. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. **Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto-SP**, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.33, p.169-174, mar-abr, 2000.

TAKAYANAGUI, O. M.; CAPUANO, C. A. D.; OLIVEIRA, A. M.; BERGAMINI, M. H. T.; OKINO, A. A. M. C.; CASTRO E SILVA, M. A. O.; RIBEIRO, E. G. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. **Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto-SP**, Revista da Sociedade Brasileira Tropical, v.40, p.239-241, mar-abr, 2007.

TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D. **Identificação, Patogenicidade e Sensibilidade a produtos químicos *in vitro* de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2000. 74 f. Dissertação (Mestrado), ESALQ, Piracicaba - SP.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F. **Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processados**. Higiene Alimentar, v.17, n.107, p. 52-55, abr. 2003

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia : Revista e atualizada**. 4° ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

UCHOA, C. M. A.; ALBUQUERQUE, M. C.; CARVALHO, M. C.; FALCÃO, A. O.; SILVA, P.; BASTOS, M. P. **Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro - Brasil**. Revista de Instituto Adolfo Lutz, Rio de Janeiro, v.60, n.2, p. 97-101, 2001.

UNGAR, M. L.; GERMANO M. I. S.; GERMANO, P. M. L. I. **Riscos e conseqüências da manipulação de alimentos para a saúde pública.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.6, n.21, p14-21, 1992.

VANDERZANT, Carl; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compedium of methods for the microbiological examination of foods.**3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

VIEIRA, R. H. S. F.; OLIV EIRA, R. A. **Avaliação do grau de contaminação fecal da água e do camarão sossego (*Macrobrachium jelskii*), na Lagoa de Parangaba** (Fortaleza, Ceará). Hig. Aliment., v.15, n. 80/81, p. 69-74, jan./fev. 2001

WATADA , A. E.; KO, N. P.; MINOTT, D. A. **Factors affecting quality of freshcut horticultural products.** Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v.9, 1996, p.115-125.

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

WORLD RESOURCE INSTITUTE AND INTERNATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT. World Resources 1988-89. New York: Basic Books, 1988.p.128.

ZACCARELLI, E.; COELHO, H. D. S.; SILVA, M. E. P. **O jogo como prática educativa no treinamento para controle higiênico-sanitário, em unidades de alimentação e nutrição.** Revista Higiene Alimentar, v.14, n.70, p.23-26, 2000.

ANEXO A



Figura 10 - Sistema de cultivo Tradicional (solo)



Figura 11 - Água de enxágüe das hortaliças

ANEXO B



Figura 12 - Sistema de cultivo Hidropônico



Figura 13 - Processo de colheita e embalagem das hortaliças em cultivo hidropônico

ANEXO C



Figura 14 - Cadastro e verificação das condições de transporte das amostras no Laboratório Escola de Análises Clínicas – FEF



Figura 15 - Tubos múltiplos para análises de coliformes totais e coliformes termotolerantes em alface e sua água de enxágüe.

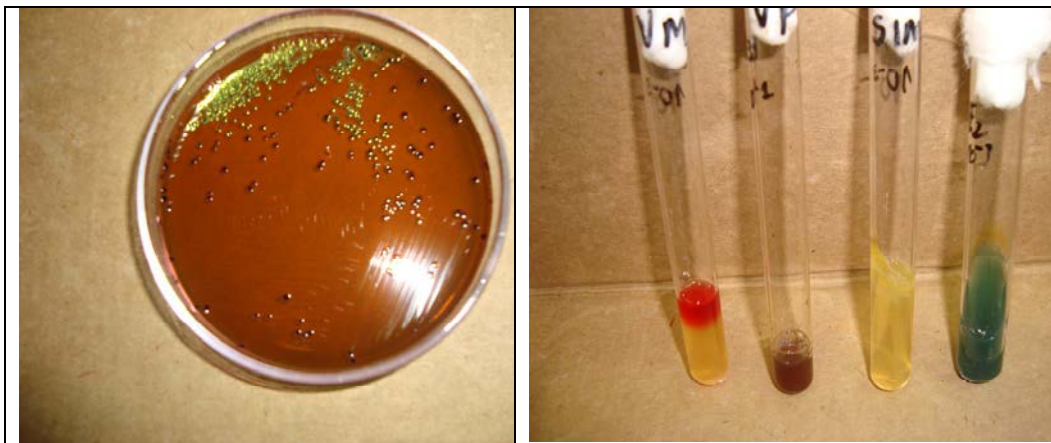


Figura 16 - Identificação de *Escherichia coli* pelo método tradicional de contagem

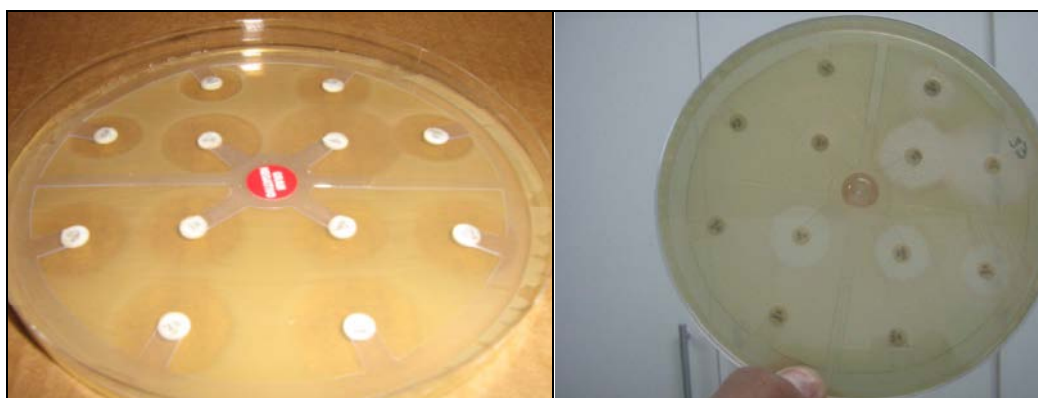


Figura 17 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de Difusão-discos

ANEXO D

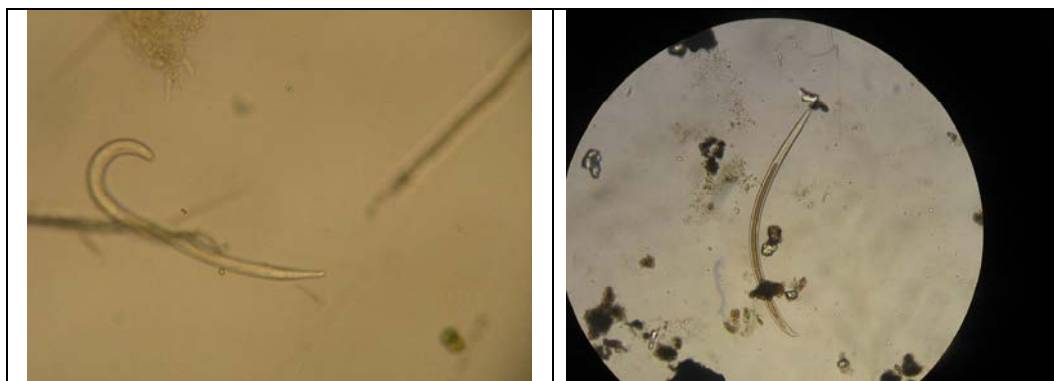


Figura 18 - Larva de *Strongylóides stercoralis* à esquerda e a direita uma larva de vida livre.