

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA NOS  
PROCESSOS DE HIGIENIZAÇÃO DE ALFACES (*Lactuca  
sativa L.*) DE DIFERENTES CULTIVOS**

**EVELINE DE ALENCAR COSTA**

FORTALEZA  
2011

EVELINE DE ALENCAR COSTA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA NOS  
PROCESSOS DE HIGIENIZAÇÃO DE ALFACES (*Lactuca  
sativa L.*) DE DIFERENTES CULTIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo  
Co-Orientadora: Dra. Cristina de Souza Chaves

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

FORTALEZA  
2011

C871a Costa, Eveline de Alencar  
Avaliação microbiológica e parasitológica nos processos de higienização de alfaces (*Lactuca sativa L.*) de diferentes cultivos / Eveline de Alencar Costa. – 2011.  
114 f. : il. color., enc.

Orientadora: Profa. Dra Evânia Altina Teixeira de Figueiredo  
Co-orientadora: Profa. Dra.Cristina de Souza Chaves  
Área de concentração: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2011.

1. Alface 2. Avaliação microbiológica 3. Higiene dos alimentos I. Figueiredo, Evânia Altina Teixeira de (Orient.) II. Chaves, Cristina de Souza (Co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos IV. Título

**EVELINE DE ALENCAR COSTA**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA NOS  
PROCESSOS DE HIGIENIZAÇÃO DE ALFACES (*Lactuca  
sativa L.*) DE DIFERENTES CULTIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Dissertação aprovado em: 30/06/2011

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo  
ORIENTADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina de Souza Chaves  
CO-ORIENTADORA

---

Profa. Dra. Isabella Montenegro Brasil  
MEMBRO

---

Pesquisadora Dra. Maria de Fátima Borges  
MEMBRO

---

Profa. Dra. Yacy Mendonça de Almeida  
MEMBRO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, precisamente ao departamento de Tecnologia de Alimentos pelo acolhimento e oportunidade dada.

Às Professoras Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo e a Dra. Cristina Chaves Souza pelas horas dedicadas à minha orientação, pela motivação, acolhimento e exemplos que são de profissionais.

Às Professoras Ms. Consuelo Landim e Dra. Maria Nilka de Oliveira pela motivação, companheirismo e amizade construída.

Ao Alísio Girão e Josias Martins Vale pela colaboração nas minhas análises, realizando leituras e tirando dúvidas laboratoriais em parasitologia quando solicitados.

À Profa. Dra. Jânia Teixeira e a Lucicleide Sousa Barros pelo carinho e prestatividade em acolher-me no setor de parasitologia do Depto. de Medicina e Patologia Legal.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Machado pela amizade e aos conselhos oferecidos durante toda a elaboração deste.

Ao Prof. Dr. Paulo César Almeida pela colaboração nas minhas análises estatísticas.

As bolsistas que me auxiliaram nesta pesquisa, Anaftália Felismino, Lívia Nery e Lara Cerqueira: pelo empenho e colaboração nas minhas análises. Gostaria de deixar registrado que foram anjos que Deus colocou no meu caminho. Em especial a Lara, que juntas compartilhamos momentos imprescindíveis ao nascimento de uma bela amizade.

As demais bolsistas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos pelo apoio e colaboração: Ana Cristina, Cristiane Pereira, Cristiane Rodrigues, Gisele Almada, Mariana Benigno, Yana Pereira, Valéria Vasconcelos e em especial as engenheiras de alimentos Gisane Maia e a Natália Moura pelos conselhos e sabedoria nos ensinamentos laboratoriais.

À empresa DUTOKA Comércio e Representações por ter concedido o detergente, produzido pela *Niponn Chemical*, utilizado na referida pesquisa.

Aos membros da minha banca, pelo prazer em tê-los como avaliadores desta.

Ao meu esposo, Paulo Henrique de Oliveira, pelo companheirismo e compreensão durante minhas ausências em vários momentos importantes.

À minha mãe, Fátima de Alencar, que pela simplicidade sempre me motivou e auxiliou na minha formação educacional e pelo orgulho que sentes por mim: a origem por me fazer continuar. E ao meu pai pelo patrocínio dos meus estudos ao longo da minha vida estudantil.

E à Deus, que me concedeu sabedoria, ciência, discernimento e perseverança na minha caminhada como aluna de Mestrado.

“... a cada nova experiência eu Te glorifico mais e Te ter é a maior diferença em mim...”

(Anderson Freire)

## RESUMO

A sanidade das hortaliças que são consumidas cruas é fator relevante à saúde devendo ser garantida mediante a sanitização com produtos químicos que tenham ação eficaz na eliminação, redução e/ou remoção dos contaminantes presentes. A forma tradicional de higienização de vegetais compreende a lavagem com água corrente seguida de imersão em solução de cloro a 200ppm e enxágüe para remover as sujidades remanescentes e resíduos do produto químico. No entanto, alguns estudos apontam que esta sanitização não garante a inocuidade das hortaliças, pois embora reduza a carga microbiana, não é eficiente na eliminação de algumas formas parasitárias. Diante disso, a presente pesquisa objetivou detectar microrganismos, protozoários, helmintos e artrópodes em alfaces (*Lactuca sativa*, L.), variedade crespa, provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico, na sua forma *in natura* e após dois métodos de higienização: teste (aplicação do detergente e solução clorada a 200ppm) e tradicional (uso apenas da solução clorada a 200ppm). Todas as alfaces estavam contaminadas por coliformes fecais, porém as amostras orgânicas e hidropônicas apresentaram valores médios dentro do padrão estipulado pela legislação, ( $21 \pm 74$  NMP/g e  $24 \pm 40$  NMP/g, respectivamente) ao contrário das convencionais ( $152 \pm 286$  NMP/g). Em 100% das amostras de alfaces convencionais e orgânicas não apresentaram contaminação por *Salmonella* sp., mas 20% das amostras hidropônicas estavam contaminadas por esse patógeno, sendo classificadas como impróprias para consumo. Nas análises parasitológicas foram detectados organismos potencialmente patogênicos para o homem: cistos *Giardia* sp. (2), ovos de *Ascaris* sp. (6) e ovo de *Taenia* sp. (1), com seis ocorrências em alfaces convencionais e três em orgânicas. Foram ainda detectados cistos de ameba e larvas de nematódeos morfologicamente análogos aos que se encontra no homem, porém mais provavelmente eram formas de vida livre provenientes da terra. Foram observadas em abundância formas de vida livre entre os protozoários, os helmintos nematódeos, e os artrópodes (estes com destaque nas alfaces hidropônicas) veiculados nas sujidades das alfaces, refletindo a composição dos ambientes de cultivo. Avaliando os dois processos de sanitização estudados constatou-se que a média dos valores de coliforme fecal nos diferentes tipos de alfaces foi menor no método teste do que no tradicional, evidenciando maior eficiência. A etapa da pré-lavagem reduziu em 60% a contaminação inicial de coliformes fecais; a lavagem com detergente foi eficaz quando comparada com a redução obtida na etapa seguinte. O método tradicional promoveu diminuição significativa na contaminação inicial de coliformes fecais, no entanto, não houve diferença significativa quando comparada com o método teste nem com a etapa da lavagem com detergente isoladamente, comprovando mais uma vez a eficácia deste último. Para a remoção das formas de helmintos, protozoários e artrópodes em geral, ambos os métodos foram eficientes, sem apresentarem diferença significativa. Quando foram analisadas separadamente as diferentes etapas dos procedimentos de higienização, constatou-se que houve significância estatística para a remoção de helmintos, com melhor eficiência do procedimento teste, podendo-se sugerir que a higienização realizada apenas com detergente alcançaria os mesmos resultados de detergente e cloro. Deste modo, concluímos que a higienização teste, tanto para a remoção de helmintos como para a redução de coliformes fecais, apresentou maior eficácia.

**Palavras chaves:** hortaliças, sanitização, detergente, qualidade microbiológica, qualidade parasitológica.

## ABSTRACT

The vegetables sanity that are eaten raw is a relevant factor to health must be ensured by sanitizing with chemicals that have effective action to eliminate, reduce and / or removal of contaminants. The traditional way of cleaning includes washing vegetables under running water followed by immersion in 200ppm chlorine solution and rinse to remove dirt and remnants of the chemical waste. However, some studies indicate that this sanitization does not guarantee the safety of vegetables, for though while reduces the microbial load, it is not efficient in the elimination of some parasitic forms. Therefore, this study aimed to detect microorganisms, protozoa, helminths and arthropods in lettuce (*Lactuca sativa* L.), curly variety, from conventional farming, organic and hydroponic, in its fresh form and after two methods of cleaning: test (application of detergent and chlorine solution to 200ppm) and traditional (use of only a 200ppm chlorine solution). All lettuce were contaminated by fecal coliforms, but the hydroponic and organic samples had mean values within the standard stipulated by law,  $21 \pm 74$  NMP/g and  $24 \pm 40$  NMP/g, respectively) unlike the conventional ( $152 \pm 286$  NMP/g). In 100% of the samples of conventional and organic lettuces were not contaminated with *Salmonella* sp. but 20% of hydroponic samples were contaminated by this pathogen, being classified as unfit for consumption. In parasitological analyses were detected in organisms potentially pathogenic to humans: *Giardia* sp cysts. (2), eggs of *Ascaris* sp. (6) and eggs of *Taenia* sp. (1), with six occurrence in three lettuces in conventional and organic. *Giardia* sp cysts. (2), eggs of *Ascaris* sp. (6) and eggs of *Taenia* sp. (1), with six occurrence in three lettuces in conventional and organic. Yet been detected amoeba cysts and larvae of nematodes morphologically similar to those found in man, but more likely were forms of life free from the earth. Forms were observed in abundance among free-living protozoa, nematodes, helminths, and arthropods (especially those in hydroponic lettuce) served in lettuce dirt, reflecting the composition of culture environments. Evaluating the two processes of sanitization studied it was found that the mean of fecal coliform in the different types of lettuce was lower in the test method than the traditional, with increased efficiency. The stage of pre-washing reduced by 60% the initial contamination of fecal coliform, the detergent wash was effective when compared with the reduction achieved in the next step. The traditional method promoted significant decrease in the initial contamination of fecal coliform bacteria, however, no significant difference when compared with the test method or with the step of washing with detergent alone, proving once again its effectiveness. For removal of the forms of helminths, protozoa and arthropods in general, both methods were effective, showing no significant difference. When analyzed separately the different stages of cleaning procedures, it was found that there were significant for the removal of helminths, with better efficiency of the testing procedure, which may suggest that the cleaning with detergent performed only achieve the same results of detergent and chlorine. Thus, we conclude that test hygienization, both for the removal of helminths as to reduce fecal coliform bacteria, showed greater efficacy.

**Key words:** vegetables, sanitization, detergent, microbiological quality, parasitological quality.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Contagem de bolores, leveduras e coliformes totais em alfaces minimamente processadas submetidas a diferentes concentrações de solução de hipoclorito de sódio e armazenadas a 2°C realizada por Berbari et al. (2001).....	30
Tabela 2	Resultados da eficácia de diferentes soluções utilizadas na desinfecção de alfaces parasitadas, obtidos por Soares e Cantos (2005).....	32
Tabela 3	Características dos produtos detergentes e desinfetantes testados por Massara e colaboradores (2003).....	33
Tabela 4	População de coliformes fecais em amostras de alfaces provenientes de cultivo convencional higienizadas pelos métodos teste e tradicional.....	60
Tabela 5	População de coliformes fecais em amostras de alfaces provenientes de cultivo orgânico higienizadas pelos métodos teste e tradicional.....	61
Tabela 6	População de coliformes fecais em amostras de alfaces provenientes de cultivo hidropônico higienizadas pelos métodos teste e tradicional.....	62
Tabela 7	Comparação dos métodos de higienização empregados, independente dos tipos de alface.....	65
Tabela 8	Valores médios da contagem de coliformes fecais nas amostras de alface de cultivo convencional, orgânico e hidropônico higienizadas pelos métodos teste e tradicional.....	67
Tabela 9	Remoção do total de helmintos, protozoários e artrópodes nos três tipos de alfaces após o método teste e o método tradicional.....	73
Tabela 10	Remoção do total de helmintos, protozoários e artrópodes após cada etapa dos dois métodos de higienização.....	79

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Resumo comparativo dos ciclos de vida dos nematódeos parasitas do homem e dos nematódeos de vida livre.....	48
Figura 2	Fluxograma do preparo das amostras.....	52
Figura 3	Fluxograma dos métodos de higienização das alfaces e etapas de coletas de amostras para análises.....	53
Figura 4	Presença de helmintos, protozoários e artrópodes nas alfaces de diferentes cultivos.....	70
Figura 5	Comparação da remoção total de protozoários, helmintos e artrópodes das alfaces de diferentes cultivos após as etapas dos métodos de higienização.....	72
Figura 6	Remoção de protozoários, helmintos e artrópodes das alfaces convencionais após as etapas da higienização pelo método teste e tradicional.....	75
Figura 7	Remoção de protozoários, helmintos e artrópodes das alfaces orgânicas após as etapas da higienização pelo método teste e tradicional.....	76
Figura 8	Remoção de protozoários, helmintos e artrópodes das alfaces hidropônicas após as etapas da higienização pelo método teste e tradicional.....	77
Figura 9	Remoção (%) de larvas/adultos e ovos de helmintos das alfaces convencionais e orgânicas.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BS	Ágar Bismuto Sulfito
CLS	Caldo Lauril Sulfato Triptose
CNNPA	Comissão Nacional Normas e Padrões Técnicos para Alimentos
CVS	Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde
EC	Caldo <i>E. coli</i>
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	Ágar Entérico de <i>Hectoen</i>
IFOAM	<i>International Federation of Organic Agriculture Movements</i>
LIA	Ágar Lisina Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MO	Microscópico óptico
MS	Ministério da Saúde
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFT	Fluxo Laminar de Nutrientes
NMP	Número Mais Provável
RDC	Resolução Decreto
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
VM/VP	Vermelho de Metila e <i>Voges Proskauer</i>
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivos gerais.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Características biológicas da Alface ( <i>Lactuca sativa L.</i> ).....	17
3.2 Tipos de cultivo da Alface ( <i>Lactuca sativa L.</i> ).....	18
3.2.1 Cultivo convencional .....	19
3.2.2 Cultivo orgânico .....	21
3.2.2.1 Certificação dos produtos orgânicos.....	24
3.2.3 Cultivo hidropônico.....	25
3.3 Controle higiênico-sanitário das hortaliças consumidas cruas.....	26
3.4 Produtos químicos utilizados na higienização de hortifrutis: sanitizantes e detergentes.....	28
3.5 Patógenos em alimentos e hortaliças.....	34
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.5.2 <i>Salmonella sp.</i> .....	37
3.6 Protozoários, helmintos e artrópodes.....	38
3.6.1 Protozoários.....	39
3.6.2 Helmintos.....	42
3.6.2.1 Platyhelminthes.....	43
3.6.2.2 Cestódeos.....	43
3.6.2.3 Trematódeos.....	44
3.6.2.4 Nematódeos.....	44
3.6.3 Artrópodes .....	49
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
4.1. Obtenção das amostras.....	51
4.2. Preparo das amostras.....	51
4.3. Higienização das amostras.....	52
4.4 Análises microbiológicas.....	54
4.4.1 Preparo das amostras para a análise de coliformes fecais.....	54
4.4.2 Determinação do número mais provável de coliformes fecais (APHA,2001).....	54
4.4.3 Pesquisa do gênero <i>Salmonella</i> .....	55
4.5 Determinação de helmintos, protozoários e artrópodes em alfaces... 4.5.1 Descrição do procedimento analítico.....	57
4.6 Análise Estatística.....	58

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
5.1 Determinação de coliformes fecais nas alfaces <i>in natura</i> de diferentes cultivos e o efeito dos processos de higienização.....	59
5.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. nas alfaces convencionais, orgânicas e hidropônicas.....	68
5.3 Detecção de helmintos, protozoários e artrópodes nos alfaces <i>in natura</i> , provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico e após os métodos de higienização empregados.....	70
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	85
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>APÊNDICE</b> .....	104
<b>ANEXO</b> .....	113

## 1 INTRODUÇÃO

Os vegetais inseridos na dieta muitas vezes são consumidos crus sendo necessário submetê-los ao processo de higienização que compreende as etapas de lavagem e desinfecção. Essa sanitização tem papel fundamental para a prevenção de doenças veiculadas por alimentos, pois visa à redução ou eliminação de agentes etiológicos que podem causar patologias humanas. Assim, a intensidade da carga microbiana encontrada nesses alimentos, tanto na forma *in natura* ou depois de higienizados, indica o nível de contaminação e ou sanidade dos mesmos e o risco que podem trazer à saúde humana (GERMANO; GERMANO, 2008; JAY, 2005; SANTANA *et al.*, 2006).

A higienização tradicional de vegetais estabelecida pela legislação (BRASIL, 2004) considera duas etapas: a lavagem com água corrente e a sanitização por imersão em solução clorada a 200ppm, por no mínimo 15 minutos. Vários autores, dentre eles Parteli e Gonçalves (2005), Paula *et al.* (2003) e Soares (2004), confirmam a eficácia desse procedimento para a redução da contaminação bacteriana, porém algumas formas parasitárias ou de vida livre, incluindo cistos e trofozoítos de protozoários, ovos, larvas e formas adultas de helmintos e artrópodes, são resistentes a ação do cloro e seus derivados. Diante de tal fato, é que se objetivou realizar o estudo de um novo método de higienização de hortifrutis o qual compreende a inclusão de uma nova etapa no processo tradicional, como o uso de detergente específico para vegetais a fim de verificar sua ação quanto à remoção bacteriana e das formas parasitárias ou de vida livre.

É válido ressaltar que poucos estudos foram realizados quanto à eficácia do uso de detergente para a lavagem de vegetais e, que, o produto utilizado nesta pesquisa foi pouco investigado. Destaca-se ainda, que seu uso restringe-se apenas ao nível industrial e, portanto, limitado ao âmbito dos diversos serviços de alimentação e ao doméstico.

No presente estudo escolheu-se a alface (*Lactuca sativa L.*), variedade crespa, devido alguns fatores entre eles a sua preferência para o consumo, disponibilidade durante o ano inteiro, importância agroeconômica e facilidade em ser cultivada por vários tipos de plantio: método convencional que utiliza agroquímico; sistema orgânico, também conhecido como sistema agroecológico devido ao não

uso de agrotóxicos; e hidropônia, que se baseia no plantio suspenso com fluxo de substância nutritiva. (YURI *et al.* 2004; NETO; FERREIRA; PONTES, 2009; MAISTRO, 200; ORMOND *et al.*, 2002; ANDRIOLO *et al.*, 2004).

Assim, buscou-se determinar a qualidade sanitária de amostras de alfaces (*Lactuca sativa L.*) *in natura* de cultivo convencional, orgânico e hidropônico, comercializadas em Fortaleza-Ceará – Brasil e avaliar a eficiência de dois processos de higienização na redução da contaminação biológica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a qualidade sanitária de amostras de alfaces (*Lactuca sativa L.*) de cultivo convencional, orgânico e hidropônico, comercializadas em Fortaleza – Ceará – Brasil e avaliar a eficiência de dois processos de higienização na redução da contaminação biológica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar através de análise microbiológica e parasitária as etapas dos processos de higienização de alfaces de cultivo convencional, orgânico e hidropônico, pelo método tradicional (pré-lavagem e sanitização) e método teste (pré-lavagem, lavagem com detergente e sanitização);
- Verificar a contaminação por coliformes fecais e a incidência de *Salmonella* sp. em amostras de alfaces de cultivo convencional, orgânico e hidropônico coletadas em hortas, mercados, supermercados e feiras do município de Fortaleza-Ce/Brasil e após cada etapa dos processos de higienização;
- Identificar a presença de helmintos, protozoários e artrópodes em amostras de alfaces de cultivo convencional, orgânico e hidropônico, coletadas em hortas, mercados, supermercados e feiras do município de Fortaleza-Ce/Brasil e a eficiência dos processos de higienização para a remoção destes.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Características agronômicas da alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta pertencente à família *Asteraceae* caracterizada por ser uma planta herbácea, com caule de tamanho pequeno e não ramificado, apresentando folhas grandes, podendo ser lisas ou crespas, as quais variam quanto à cor, desde tonalidades de verde (do claro ao escuro) até a coloração roxa, como em outros cultivares. Em algumas essa pigmentação arroxeadada aparece apenas nas bordas das folhas (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

É uma hortaliça de origem asiática e atualmente é encontrada em diversas regiões de clima temperado. Também é considerada a mais popular das hortaliças folhosas, sendo cultivada em quase todas as regiões do globo terrestre. Acredita-se que foi trazida para o Brasil por influências portuguesas e hoje é uma das hortaliças mais consumida no país como componente básico de saladas e outras preparações no âmbito doméstico como comercial (LIMA, 2007; MORETI, 2007)

A sua preferência para o consumo faz com que tenha destaque agroeconômico e conseqüentemente ganha relevância na área da pesquisa, sendo bastante estudada sobre seu cultivo, qualidade sanitária, condições microbiológicas e ou parasitárias (PARTELLI; GONÇALVES, 2005)

Quanto a sua fitotecnia pode-se descrever as seguintes características: planta herbácea, que desenvolve um caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas são delicadas e crescem em formato de rosetas, podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma “cabeça”, ou seja, o conjunto das folhas que são desenvolvidas em vários tons de verde e ou roxo, conforme a pigmentação do cultivar (Anexo A). Apresenta sistema radicular muito ramificado e superficial atingindo profundidade de até 0,60cm (FILGUEIRA, 2003).

Existem tipos de alfaces com características bem definidas, porém possuem vários cultivares (variedades de uma mesma espécie) com peculiaridades

distintas (Anexo B). De acordo com Mogharbel e Masson (2005) os tipos mais comuns são:

a) Alface Crespa ou “Iceberg”: forma cabeça larga, pesada e compacta. As folhas são crocantes e nervuradas, porém são frágeis;

b) Alface Manteiga: possui cabeça aberta, folhas delicadas de textura macia;

c) Alface Romana: não desenvolve uma cabeça verdadeira, sendo caracterizada pela formação de folhas eretas, alongadas e largas, no entanto, muitas vezes podem ser grossas.

d) Alface Folhosa: assemelha-se à Romana por também não produzir cabeça bem definida. Por outro lado, diferencia-se por formar folhas mais alongadas, separadas e de tamanho menor.

O plantio da alface torna-se favorável devido à sua facilidade de produção o que favorece para o alto consumo por causa do seu fácil acesso, pois são cultivadas durante todo o ano (LEITE, 2000; MONTAHER *et al.*, 2007).

### **3.2 Tipos de cultivo da alface (*Lactuca sativa* L).**

No Brasil são cultivados cerca de 30 mil hectares de alface contabilizados em hortas de grande e pequeno cultivo. Em Fortaleza-CE foram cadastradas 165 hortas, distribuídas nas seis regionais do município, que cultivam várias hortaliças, dentre elas a alface, de diferentes tipos e variáveis (LEITE, 2000).

O cultivo convencional ainda é o mais empregado, comparando-o com a produção hidropônica e a orgânica, as quais requerem cuidados específicos proporcionando maior custo ao produto final. Assim, as práticas agrícolas aplicadas no cultivo dessa hortaliça influenciam diretamente nas suas propriedades nutricionais e sanitárias (SANTANA *et al.*, 2006).

Nesse tipo de cultivo, as touceiras ou pés de alfaces são plantados em canteiros de terra, em hortas urbanas ou rurais, onde permanecem em contato com a terra durante todo o seu desenvolvimento. É necessária irrigação freqüente, pois o solo deve ser mantido constantemente úmido, principalmente em períodos de estiagem. A adubação também deve proporcionar ao vegetal os nutrientes

essenciais para o seu crescimento. Quando se utiliza adubos provenientes de esterco de animais compostado, principalmente no plantio orgânico como também no convencional, podem carrear contaminantes parasitários e bacteriológicos de risco à saúde (PARTELI; GONÇALVES, 2005).

O ponto de colheita da alface se dá quando seu ciclo vegetativo finaliza-se, ou seja, quando atinge todo o desenvolvimento de suas folhas. O grau de desenvolvimento varia conforme o tipo de alface bem como a finalidade da produção. Para aquelas destinadas à comercialização *in natura* ou mesmo para ser minimamente processada, devem apresentar “cabeça” completamente formada. Portanto, recomenda-se colhê-la na maturidade ideal, pois aquelas muito maduras são menos saborosas do que as imaturas, apresentando sabor amargo, tornando-a inaceitável ao consumo. O momento ideal para a colheita depende ainda de um cultivar para outro, geralmente é realizado entre 60 a 70 dias após ter sido semeado, período em que a cabeça atinge sua formação completa. Respeitando-se este ponto de maturação a planta desenvolve maior defesa contra o ataque de microrganismos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

### 3.2.1 Cultivo convencional

No cultivo convencional alcançam-se altas produtividades devido ao uso intensivo de adubos minerais e agrotóxicos, os quais têm sido questionados nos últimos anos principalmente pelas questões ecológicas, de saúde humana e econômicas (YURI *et al.* 2004).

Várias pesquisas em relação a este tipo de agricultura são realizadas a fim de obter aumento da produtividade aliado a qualidade da hortaliça. Maggi *et al.* (2006) afirmam que vários experimentos são realizados a fim de melhorar as técnicas de irrigação, bem como o cultivo sob ambiente protegido, o enriquecimento do solo com diversos minerais e outros.

Todos estes estudos visam ultrapassar as limitações que a alface sofre para se desenvolver, pois seu manejo, a pesar de ser considerado fácil é muito influenciado quanto às condições adversas de temperatura, umidade e chuva (LIMA, 2007).

O solo para o cultivo convencional da alface deve ser rico em matéria orgânica, com boa disponibilidade de nutrientes e apresentar textura média. Para aumentar a sua produtividade Souza e colaboradores (2005) sugerem o uso de fertilizantes para melhoria das condições físicas, químicas e biológicas do solo, por meio do enriquecimento com doses crescentes de compostos orgânicos.

A qualidade do solo também é baseada na microbiota presente nele, ou seja, pelas bactérias, helmintos, artrópodes e protozoários que o compõe sendo, atualmente, considerados bioindicadores para as boas condições de uso e bom desenvolvimento dos cultivos. Principalmente como indicadores do nível de agrotóxicos, os quais influenciam na microbiota da terra (LIANG *et al.*, 2005; TOMAZINI, FERRAZ, MONTEIRO, 2008).

O clima influencia diretamente no plantio dessa hortaliça, pois a maioria dos cultivares não atinge bom desenvolvimento em temperaturas altas (acima de 20°C) e em períodos longos com escassez de chuva que conseqüentemente, acabam promovendo seu pendoamento precoce favorecendo para que a folhagem torne-se amarga e com a presença de substância leitosa (acúmulo do látex). Por outro lado, existem no mercado variedades de alface que passaram por melhoramento genético e que se adaptam muito bem a climas quentes (plantio de verão) permitindo seu cultivo o ano inteiro (YURI *et al.*, 2005)

A irrigação é primordial no cultivo das hortaliças, principalmente em regiões semi-áridas, em que não há chuvas freqüentes. O plantio deve ser constantemente úmido, logo a água deve atender aos padrões mínimos de qualidade, como aponta Germano e Germano (2008), tanto sob o aspecto microbiológico como parasitário.

Dentre as variedades de alface cultivadas convencionalmente, pode-se afirmar, conforme Favaro-Trindade (2007), que os tipos crespa e lisa são as mais produzidas.

Filgueira (2003) discorre sobre a suscetibilidade da alface às doenças fitossanitárias que são fatores limitantes para o seu manejo. Sabe-se que mais de setenta e cinco tipos de doenças podem atingir a hortaliça e, estas são evitadas a partir do uso de produtos tóxicos. Essa prática traz prejuízos à saúde dos consumidores, bem como daqueles que manipulam a hortaliça no solo.

### 3.2.2 Cultivo orgânico

A Instrução Normativa Nº 064/2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2008), define o sistema orgânico de produção agropecuária e industrial como sendo todo aquele em que se adote tecnologias que otimizem o uso dos recursos naturais e socioeconômicos e que desenvolvam o respeito e a integridade cultural a fim de obter auto-sustentação. Além disso, considera a independência dos recursos não-renováveis, dentre eles os agrotóxicos e outros insumos artificiais tóxicos, bem como a ciência da transgenia e das radiações ionizantes, tudo isso para privilegiar a saúde ambiental e a humana.

De forma mais sucinta, Mello *et al.* (2003) afirmam que a agricultura orgânica se dá pela produção de vegetais sem o uso de agrotóxicos e adubos químicos sintéticos ou outros contaminantes. Além disso, trazem um enfoque social, pois a maioria dos produtores dedicados a este tipo de cultivo são pequenos agricultores que buscam nesta atividade uma fonte de renda.

Em resumo, este tipo de produção traz consigo conceitos que abrangem os processos conhecidos atualmente como ecológico, natural, biodinâmico, sustentável, biológico, agroecológico e permacultural (LIMA, 2007, LINHARES, 2005).

O cultivo agrônomico busca manter de forma permanente as áreas de preservação, o uso racional dos recursos naturais, o melhoramento genético (visando à adaptabilidade às condições ambientais locais), a manutenção e ou recuperação das variedades locais ameaçadas pela erosão genética e o equilíbrio do sistema de produção como estratégia de promover a sanidade da vegetação e dos animais, fazendo com que interajam entre si (BRASIL, 2008).

Para o plantio adotando este sistema agroecológico é comum fazer a associação de culturas, ou seja, plantar vários tipos de hortaliças em uma mesma área adotando técnicas de rotação de culturas<sup>1</sup>, ou consórcios<sup>2</sup>, ou uso de cobertura

---

<sup>1</sup> Rotação de cultura: consiste em um planejamento racional da plantação de diferentes produtos, alterando a distribuição no terreno por um determinado tempo (SOUZA *et al.*, 2006).

<sup>2</sup> Consórcio de culturas: é o plantio de diferentes espécies vegetais, simultaneamente sobre uma mesma área. As plantas podem interferir uma sobre as outras de forma positiva, estimulando a velocidade de crescimento, aumentando o tamanho e a qualidade dos frutos e a resistência à pragas e doenças, ou negativa, inibindo ou retardando o crescimento. Para isso pode-se utilizar adubação

morta e viva do solo<sup>3</sup>. A manipulação e o armazenamento do esterco ou as áreas de compostagem necessitam ser projetadas e operadas a fim de prevenir a contaminação das águas superficiais ou do lençol freático. O uso dos reguladores sintéticos de crescimento é proibido pela legislação atual, que também assegura preferencialmente o uso de sementes e mudas provenientes de cultivo orgânico (BRASIL, 2008, LIMA, 2007).

O cuidado com o solo é fator primordial para sustentar este tipo de plantio e garantir a sanidade dos vegetais cultivados. O adubo, por exemplo, deve ser rico em matéria orgânica “saudável”, ou seja, com microbiota adequada a terra e não patogênica ao homem que trabalha diretamente com a terra e que consome o vegetal. Assim, recomenda-se que o adubo utilizado não tenha dejetos humanos e, portanto, que sejam curtidos, em sistema de compostagem ou ainda adubos verdes, esterco bovino compostado e composto de farelos anaeróbios (REZENDE *et al.*, 2007; SOMINEZ *et al.*, 2007).

Os agricultores da lavoura de orgânicos no início dos primeiros anos de grande cultivo encontraram dificuldades, principalmente no que diz respeito às pragas e doenças que surgem no plantio. Daí mecanismos físicos e biológicos foram desenvolvidos a fim de manter tal cultivo, dentre eles o uso do próprio ecossistema, que faz com que o agricultor desfrute das barreiras naturais de ventos e utilizando outras plantas. Daí a área de cultivo ter seus próprios defensores como predadores dos invasivos, assim, o número de artrópodes tende ser grande a fim de manter equilíbrio ecológico (LIMA, 2005).

Para o plantio das alfaces orgânicas é importante escolher as cultivares mais adaptadas às condições locais, que tenham boa capacidade de exploração do solo e elevada resistência a pragas e doenças. Resende *et al.* (2007), mencionam os tipos e variedades de alfaces que são mais produzidas pelo sistema orgânico:

---

verde que é o cultivo de espécies (geralmente legumes) com a intenção de adicionar matéria orgânica, reciclar nutrientes e fixar nitrogênio biologicamente (ORMOND *et al.*, 2002).

<sup>3</sup> A cobertura morta: ajuda a manter a umidade do solo, não deixando o mesmo ficar ressecado, nem crescer muito o mato, protegendo a matéria orgânica do solo e assim, quando chove a água penetra mais facilmente, não ocorrendo erosão. Com o passar do tempo, esta cobertura se decompõe, se transforma em nutrientes para o solo e aumenta a atividade biológica do solo (PEDROSO, 2000).

A cobertura viva: compreende a vegetação nativa que cobre o solo, preferencialmente plantas que tenham profundidades e formatos de raízes diferentes, formando uma rede protetora do solo. A cobertura viva protege o solo da erosão de uma forma geral, e no caso das margens dos rios, evita que a terra desbarranque para a água (PEDROSA, 2000).

- a) Tipo americanas das variedades “Robinson”, “Laurel” e “Madona AG 60”;
- b) Tipo crespa, as quais apresentam ótimo desempenho durante o cultivo e incluem as variedades “Simpson”, “Mônica” e “Grand Rapids”;
- c) E as do grupo “lisas” destacando-se os cultivares “Regina”, “Babá de Verão” e a “Aurélia”.

Darolt (2003) apresenta evidências quanto à superioridade nutricional dos produtos orgânicos em relação ao convencional, bem como o menor risco toxicológico, sendo este evidente. O mesmo autor divulga resultados obtidos quanto ao teor de nitrato encontrado em amostras de alface cultivada em sistema orgânico, as quais apresentaram concentração menor que 1.000mg/kg ao contrário daquelas cultivadas convencionalmente (teores próximos e superiores a 6.000mg/kg). O mesmo autor acrescenta ainda, que o nitrato presente em grandes quantidades nas hortaliças significa perigo a saúde do homem, pois ao ser ingerido passa à corrente sanguínea podendo, então, reduzir a nitritos que são venenosos e bem mais perigosos quando combinados com aminas, formando as nitrosaminas, substâncias cancerígenas, mutagênicas e teratogênicas.

O crescimento da produção das hortaliças pelo sistema orgânico se dá principalmente pelos efeitos benéficos sobre as características físicas e químicas do solo, pelo custo elevado dos adubos minerais solúveis e ao marketing realizado em torno da produção orgânica de alimentos (SANTOS *et al.*, 2001; SOMINEZ *et al.*, 2007)

O consumidor ao escolher o produto orgânico não consegue sensorialmente distingui-lo daquele cultivado convencionalmente e, por essa razão, toma a decisão de compra pelas informações sobre as vantagens nutricionais, salubridade e isenção de produtos químicos que são mencionadas por meio da embalagem e ou rótulo, ou por outros meios de *marketing*. Devido a estes fatores são considerados produtos de qualidade. No entanto, torna-se necessário a certificação dos produtos desse segmento por entidades que garantam ao consumidor a veracidade e a confiabilidade naquilo que estão adquirindo (ORMOND *et al.*, 2002)

### 3.2.2.1 Certificação dos produtos orgânicos

A certificação dos orgânicos no Brasil originou-se informalmente por meio do trabalho desenvolvido por organizações não-governamentais (associações e cooperativas de produtores e consumidores) que estabeleceram normas internas para a produção e comercialização, criando selos de garantia para seus produtos. O crescimento na produção e a necessidade de exportação fez com que muitos produtores buscassem a certificação junto a instituições com reconhecimento internacional (ORMOND *et al.*, 2002).

Para atender tais normas o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa N°007/99 (BRASIL, 1999) e posteriormente a de N°68/2008 (BRASIL, 2008). Ambas configuram o sistema de produção orgânica e atendem aos requisitos das certificadoras de renome internacional.

Assim, a certificação dos alimentos orgânicos ocorre sobre o processo produtivo, pois sua qualidade orgânica não pode ser testada no produto final (IBD CERTIFICAÇÕES, 2009).

Penteado (2000) levanta a consideração que no comércio direto com o agricultor o selo certificador do produto orgânico não se torna imprescindível, porém, quando a comercialização ocorre por meios diferentes, distanciais ou por distribuidores, a certificação confere segurança ao consumidor e credibilidade ao produtor e também favorece a possibilidade de rastrear a origem do orgânico. Por outro lado, tais vantagens são agregadas no valor do produto, diferenciando-se dos demais pelo seu alto custo.

Em 1972 foi criada a *International Federation of Organic Agriculture Movements* (IFOAM), organização internacional que tem como função principal avaliar, normatizar e divulgar os padrões para a comercialização de produtos orgânicos, sendo um órgão mediador composto por 770 organizações membros. Participam dessa organização pesquisadores de vários países, que discutem de forma participativa as mudanças, padrões ou estabelecimento novos padrões (SCHIMAICHEL; RESENDE, 2007).

A certificação, por ser um procedimento de verificação e de confirmação da conformidade do produto ou do processo com relação a padrões estabelecidos



faz com que as entidades e organismos que realizam esse trabalho sejam sérios e confiáveis (IBD CERTIFICAÇÕES, 2009).

Conforme *Schimaichel* e Resende (2007) o Instituto Biodinâmico de Certificações (IBD), até pouco tempo atrás, era a única entidade brasileira creditada ao IFOAM e que emitia certificados de exportação. Sabe-se que hoje, existem várias certificadoras estrangeiras filiadas no Brasil, como também as certificadoras brasileiras que possuem contato direto com outras estrangeiras.

### 3.2.3 Cultivo hidropônico

De acordo com Beninni *et al.* (2003) e Luz (2008) a técnica da hidropônia é considerada uma alternativa de cultivo, onde o solo é substituído por soluções aquosas, contendo nutrientes essenciais ao desenvolvimento da hortaliça.

Esse tipo de cultivo vem sendo empregado no Brasil há décadas e tem passado por adaptações a fim de aprimorar o crescimento, o desenvolvimento e/ou a qualidade dos produtos vegetais. Tais melhorias incluem a circulação contínua ou intermitente da solução nutritiva, o emprego de diferentes substratos e a aeroponia (ANDRIOLO *et al.*, 2004; OHSE *et al.*, 2001).

Atualmente não existe uma legislação específica para a hidroponia, porém, Martines (2008) afirma que a maioria dos cultivos hidropônicos utiliza agentes químicos ou físico-químicos no processo de obtenção de seus produtos e, portanto, a legislação que estabelece os limites de uso destes é a Instrução Normativa Nº 5/2007 do MAPA (BRASIL, 2007).

Comumente a hidroponia acontece em ambiente protegido (como estufas plásticas) onde se emprega freqüentemente a técnica do fluxo laminar de nutrientes (NFT) para aplicar a solução nutritiva. O projeto para esse tipo de cultivo adota motor-bomba, recipiente para solução nutritiva e canais de cultivo onde as plantas são depositadas. A solução rica em nutrientes passa por estes canais onde seu fluxo circula a cada 15 minutos durante o dia e a cada duas horas no período da noite (JAIGOBIND; AMARAL; JAISINGH, 2007).

Muitas fórmulas de soluções nutritivas têm sido usadas e avaliadas quanto à produtividade desse cultivo. Porém, qualquer sal pode compor a solução

para nutrir a planta sem causar danos ao seu desenvolvimento. Na escolha do fertilizante deve-se levar em consideração o preço, a solubilidade, a presença de resíduos insolúveis e a quantidade de nutrientes (COMETI *et al.*, 2008; TESTOLIN, 2009).

Pode-se citar algumas vantagens desse cultivo: maior uniformidade na produção, maior produção por área, redução do ciclo de cultivo, melhor programação da produção, menor gasto de mão-de-obra, menor incidência de pragas e doenças, uso racional de água e fertilizantes, produtos limpos e de qualidade (COSTA; JUNQUEIRA, 2000; SEDIYAMA; PEDROSA, 1999).

Diante de tais vantagens espera-se que as hortaliças cultivadas neste sistema tenham qualidade sanitária satisfatória, bem maior que nos cultivos em que o vegetal fica em contato direto com a terra.

Dentre as hortaliças a alface é a mais cultivada por este tipo de sistema, representando atualmente cerca de 80% da produção hidropônica brasileira. A alface apresenta tal preferência devido à facilidade de cultivo, grande demanda pelo mercado e redução do período de produção. Além disso, a alface hidropônica apresenta melhor aspecto sensorial, maior durabilidade e facilidade de limpeza, pois é isenta de matéria terrosa. Estes fatores contribuem para que o consumo ou preferência e produção aumentem a cada ano (BENINI *et al.*, 2003).

Conforme Sedyama e Pedrosa (1999) as melhores variedades de alfaces cultivadas no verão pelo sistema de hidroponia, em ordem significativa, são as crespas "Brisa", "Marisa" e "Verônica", as americanas "Lorca" e "Lucy Brown" e a lisa "Regina 440".

### **3.3 Controle higiênico-sanitário das hortaliças consumidas cruas**

Os alimentos a serem consumidos crus devem ser submetidos a processo de sanitização a fim de reduzir a contaminação superficial (BRASIL, 1999; BRASIL, 2004). Tais legislações recomendam a execução do processo tradicional de higienização o qual compreende uma pré-lavagem criteriosa com água corrente e em seguida, a desinfecção por meio de imersão em solução clorada, por 15 a 30 minutos; e por fim, enxágüe com água potável.

A primeira etapa, pré-lavagem, consiste em remover substâncias indesejáveis, como terra, poeira, gordura e outros, preparando o meio para que o produto a ser aplicado tenha sua ação eficaz e potencializada. A desinfecção visa reduzir, por método químico, o número de microrganismos em nível que não comprometa a qualidade higiênico-sanitária do alimento diminuindo assim a probabilidade de transmissão de agentes causadores de doenças. (BRASIL, 2004; GERMANO; GERMANO, 2008, SILVA JUNIOR, 2007)

A qualidade sanitária das hortaliças está diretamente ligada à prevenção das doenças transmitidas por alimentos. Germano e Germano (2008) afirmam que grande parte dos agentes etiológicos de enfermidades entéricas são veiculados através de vegetais contaminados, principalmente por aqueles que são cultivados em contato direto com o solo e/ou irrigados com água contaminada. Dentre os causadores de enfermidades destacam-se bactérias, helmintos, protozoários e outros agentes que fazem parte da microbiota natural das áreas de plantio.

Outro fator relevante que garante a qualidade sanitária das hortaliças que são consumidas cruas é o uso adequado dos produtos químicos na desinfecção, ou seja, como são aplicados, a diluição correta e o tempo de ação destes, os que são preponderantes para a redução da contaminação destas, a nível aceitável (SILVA JUNIOR, 2007).

Contudo, é válido lembrar que a qualidade da água também é essencial para garantir a sanidade dos alimentos, pois caso esteja contaminada, todos os procedimentos de higienização acabam sendo prejudicados. A legislação (BRASIL, 2004) recomenda a limpeza e desinfecção dos reservatórios de água, periodicamente, acompanhado de laudo que confirme a potabilidade da mesma.

É importante compreender o mecanismo natural de adesão dos microrganismos às diversas superfícies, as quais são conferidas pelas propriedades morfológicas da estrutura celular. Interromper essa aderência é um dos principais objetivos na higienização das hortaliças. As bactérias possuem sobre sua parede celular uma camada de material viscoso chamada de glicocálice que confere a aderência a célula. Essa estrutura pode apresenta seus polímeros de forma organizada e acoplada firmemente à parede celular sendo chamada de capsula, ou podem estar desorganizada e frouxamente atrelada à parede proporcionando limosidade em meio líquido (PELKZAR *et al.*,1997; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005). Os protozoários, helmintos e artrópodes possuem mecanismos específicos

de aderência, sejam aqueles que vivem em parasitose ou em vida livre. (NETO, 2008; NEVES, 2005).

Os produtos químicos utilizados na higienização agem na estrutura dos microrganismos de várias maneiras, seja por ação mecânica removendo as células presentes ou rompendo a parede e ou a membrana celular das mesmas, inativando enzimas, desnaturando proteínas e outros componentes vitais. Algumas formas são resistentes a estes produtos, como por exemplo, as formas císticas de bactérias e de protozoários (PELKZAR *et al.*, 1997; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005). Massara e colaboradores (2003) narram que ovos de *Ascaris* possuem grande capacidade de aderência sobre às superfícies ambientais ou nos alimentos, não sendo removidos com facilidade. Por isso a aplicação das substâncias utilizadas no processo de higienização deve ser eficaz na remoção, inibição ou destruição.

### **3.4 Produtos químicos utilizados na higienização de hortifrutis: detergentes e sanitizantes**

Os detergentes juntamente com a água agem sob as superfícies por ação mecânica que remove resíduos não solúveis e diminuem a carga microbiana das superfícies. O produto ao entrar em contato com a superfície a ser limpa faz com que os resíduos de sujidade sejam dispersadas no solvente evitando que se depositem novamente (ANDRADE; MACEDO, 2008).

Para se ter uma boa ação detergente o produto deve ter características emulsificantes (reduz as substâncias graxas a inúmeras partículas); umectante (diminui a tensão superficial), dissolventes (transforma os resíduos em substâncias solúveis em água), ter ação dispersante e ser inofensivo ao homem (atóxico e não corrosivo) e ter baixo custo (ANDRADE; MACEDO, 2008).

A produção industrial de detergentes para lavagem de hortifrutis é bastante restrita, havendo poucas marcas comerciais disponíveis e somente para comércio institucional. Também são raras as pesquisas sobre sua eficácia na descontaminação de vegetais.

A Resolução Normativa Nº1/78 (BRASIL, 1978) estabelece as normas para detergentes e seus congêneres. A mesma define e especifica as classificações

e composição a serem atendidas. Esta norma não faz referência ao uso para alimentos, embora detergentes para lavagem de hortifrutis sejam registrados no Ministério da Saúde. Porém, as características importantes para os detergentes destinados à lavagem de hortifrutis é que não deixem resíduos aromáticos, tóxicos e que evitem qualquer prejuízo à saúde do consumidor.

No processo de higienização ou sanitização o agente químico deve agir diretamente sobre bactérias, fungos, leveduras, protozoários, helmintos artrópodes e formas de vida livre, devendo a superfície ter sido limpa anteriormente e isenta de resíduos para não impedir ou retardar seu mecanismo de ação (ANDRADE; MACEDO, 1996; GERMANO; GERMANO, 2008; PELCZAR *et al.*, 1997).

De acordo com Berbari *et al.* (2001), várias substâncias químicas utilizadas para a higienização de frutas e hortaliças consumidas cruas têm sido estudadas, dentre elas o cloro, compostos de amônia quaternária, ácidos orgânicos (ácido cítrico), detergentes próprios e outros. No entanto, tais produtos ainda constituem foco de pesquisa de grande relevância para a saúde pública.

O cloro é o produto de maior aplicação na indústria e em estabelecimentos que comercializam alimentos. É utilizado em suas várias formas como os sais de hipoclorito, principalmente por serem de baixo custo e de boa disponibilidade comercial (SILVA *et al.*, 2003; GERMANO; GERMANO, 2008).

A legislação (BRASIL, 1999) recomenda que os produtos para a higienização de hortis devem apresentar os seguintes princípios ativos: hipoclorito de sódio a 2,0 – 2,5% (concentração de 100 a 250 ppm); hipoclorito de sódio a 1% (100 a 250 ppm), ou hipoclorito de cálcio (200 ppm) e cloro orgânico (100 a 250 ppm).

A ação germicida do cloro e seus derivados é consequência do ácido hipocloroso que se dissocia facilmente formando íon  $H^+$  e íon hipoclorito, porém sua ação antimicrobiana depende do pH da solução, que deve ser ideal em 4,5 e 7,0. De uma forma geral, a ação germicida dos compostos clorados ocorre pela destruição da síntese protéica, descarboxilação oxidativa de aminoácidos a nitrilas e aldeídos (metabolitos tóxicos), reações com ácidos nucleicos, purinas e pirimidinas, desequilíbrio metabólico após a destruição de enzimas essenciais, indução a lesões no DNA e ou na sua replicação, inibição da absorção de oxigênio e outros (ANDRADE; MACEDO, 1996; GERMANO; GERMANO, 2008).

Berbari *et al.* (2001) pesquisando sobre a ação desinfetante do cloro em diversas concentrações na água de lavagem de alfaces americanas minimamente processadas, concluíram, após análises microbiológicas para coliformes totais, bolores e leveduras, que as concentrações de 100 e 130 mg/litro foram as mais eficazes na redução das populações estudadas. Cargas microbianas iniciais de Coliformes totais reduziram em três ciclos logarítmicos, enquanto que os bolores e leveduras apresentam diminuição de um ciclo logarítmico, em seis dias de armazenamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Contagem de bolores, leveduras e coliformes totais em alfaces minimamente processadas submetidas a diferentes concentrações de solução de hipoclorito de sódio e armazenadas a 2°C realizada por Berbari *et al.* (2001).

TRATAMENTOS	Tempo de armazenamento (dias)							
	Bolores e leveduras*				Coliformes totais*			
	0	3	6	9	0	3	6	9
<i>In natura</i>	1,0x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>5</sup>	-	6,6x10 <sup>5</sup>	6,8x10 <sup>5</sup>	6,9x10 <sup>6</sup>	-
Controle	2,0x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>8</sup>
70mg/L Cl	8,0x10 <sup>2</sup>	9,3x10 <sup>2</sup>	8,7x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>5</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	6,4x10 <sup>4</sup>	6,9x10 <sup>6</sup>
100mg/L Cl	<10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>	6,3x10 <sup>2</sup>	6,1x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>	9,8x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>4</sup>
130mg/L Cl	<10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>	3,1x10 <sup>3</sup>	7,7x10 <sup>1</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>

\* UFC/g = Unidades Formadoras de Colônias – Média de duas repetições.

Fonte: (BERBARI *et al.*, 2001).

Takeuchi e Frank (2001) estudaram a eficácia do cloro (200mg/litro, 200ppm) na desinfecção de folhas de alfaces contaminadas propositalmente por *E. coli* O157:H7 (imersas em suspensão contendo 10<sup>9</sup> UFC/mL); assim, observaram, após análises por microscopia de varredura, que as células presentes na superfície do vegetal foram destruídas e aquelas que adentraram no tecido vegetal, precisamente nos estômatos, permaneceram viáveis. Verificaram ainda, que os microrganismos na região onde haviam tecidos danificados mostraram sobrevivência intermediária, ou seja, alguns permaneceram viáveis e outros foram eliminados, na mesma proporção.

O efeito bactericida do cloro também foi testado por Bruno e Pinto (2004) após quantificar a carga microbiana presente em hortaliças (salsa e coentro) que foram imersas em solução preparada a partir de diferentes diluições (1mg/L, 2mg/L, 3mg/L, 4mg/L) de água sanitária com cloro ativo e em diferentes tempos de contato

(5, 10, 15 e 20 minutos). Os resultados revelaram que o melhor tratamento foi a imersão por 20 minutos em solução de cloro recém-preparada a partir de água sanitária comercial diluída 1.000 vezes (4 mg/L de cloro ativo), pois esse binômio tempo-concentração foi o que permitiu baixas contagens de coliformes a 45°C e de bolores e leveduras para ambas hortaliças. Por outro lado, ressaltam que apesar de não ter eliminado totalmente a microbiota presente, essa prática, além de ser barata e relativamente rápida, é bastante acessível de ser realizada em qualquer estabelecimento comercial e até em nível doméstico, contribuindo para o aumento da segurança alimentar dos produtos que são preparados.

Nascimento *et al.* (2003b) realizaram uma avaliação comparativa da eficácia da sanitização de verduras (alface e repolho) e frutas (uva e morango) por imersão (por 15 minutos), em solução de hipoclorito de sódio 200ppm, dicloroisocianurato de sódio 200ppm, ácido acético 2% e 4%, ácido peracético 80ppm e vinagre a 6%, a 25% e a 50%, quantificando aeróbios mesófilos antes e após o processo. A eficiência do hipoclorito de sódio nas amostras de alface apresentaram desempenho similar ao vinagre nas concentrações de 25% e 50%, reduzindo aproximadamente 1,5 ciclos logarítmicos na contagem total de aeróbios mesófilos. Contudo, o dicloroisocianurato de sódio 200ppm e o ácido acético a 2% e 3% foram os de melhor ação, reduzindo mais do que duas casas decimais dos microrganismos em estudo. Os tratamentos com ácido acético a 6% e com o ácido peracético 80ppm foram os de menor eficácia, com desempenho equivalente ao simples enxágüe com água. No entanto, a eficácia das altas concentrações dos ácidos relatada na pesquisa, se contrapõe com o sensorial prejudicado, por exemplo, nas hortaliças a textura das folhas tende a ficar quebradiça com perdas de líquido e surgimento de pontos escuros devido a escurecimento enzimático.

O ácido peroxiacético ou peracético, utilizado por Nascimento *et al.* (2003b) nos seus experimentos, é produzido pela reação do ácido acético com peróxido de hidrogênio, na presença de ácido sulfúrico, o qual é o catalizador. É considerado mais instável do que o peróxido de hidrogênio. Na sua decomposição produz ácido acético, peróxido de hidrogênio e a água. Atualmente vem sendo muito utilizado pela indústria de alimentos, devido ao alto efeito no frio e pela boa diluição dos produtos de degradação, que não oferecem risco de toxicidade nem afetam o sabor e odor dos alimentos.

De acordo com investigações realizadas por Soares e Cantos (2005) quanto ao efeito parasiticida de soluções comerciais anti-sépticas contendo 0,025mg/mL de hipoclorito de sódio e 0,002mg/mL de permanganato de potássio; solução de ácido acético (concentração de 0,54%) e solução detergente (0,3 mg/mL de lauril éter sulfato e 0,25mg/mL de álcool láurico etoxilado), em alfaces contaminadas intencionalmente com cistos de *Giardia lamblia*, ovos de *Ascaris lumbricoides* e larvas de *Strongyloides stercoralis*, constataram percentual de remoção do número total inicial acima de 90% devido à ação de todos os produtos. No entanto, por ordem de eficácia citam: a solução anti-séptica, o ácido acético e o detergente (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da eficácia de diferentes soluções utilizadas na desinfecção de alfaces parasitadas, obtidos por Soares e Cantos (2005).

	n	NT de parasitos presentes nas soluções de desinfecção			NT de parasitos presentes na água corrente (pós-desinfecção)					
		Sd	As	Aa	Sd**	As**		Aa**		
Amostras		NT	NT	NT	NT	%	NT	%	NT	%
Alface***	50	2.360	3.960 <sup>1</sup>	520 <sup>1</sup>	110 <sup>1</sup>	<b>96,6</b>	0 <sup>1</sup>	<b>100</b>	20 <sup>1</sup>	<b>99,2</b>

Onde \* representa 50g de cada hortaliça; Sd = solução detergente; As = solução de anti-séptico; Aa = solução de ácido acético; % = percentagem de descontaminação de hortaliças; NT = número total de ovos, cistos e larvas por 50g de amostra; \*\* representa lavagem em água corrente após o uso das respectivas soluções; \*\*\* significa 50 alfaces experimentais parasitadas com material fecal; teste t (p<0,05).

Fonte: (SOARES; CANTOS, 2005).

MASSARA *et al.* (2003), em estudo realizado *in vitro* sobre a ação de dezesseis produtos, entre eles detergentes e desinfetantes, mostrados na Tabela 3, de uso doméstico e laboratorial sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, constataram que apenas uma das substâncias com ação detergente e desinfetante, (Ds5: Orto-benzil para-clorofenol 0,75%; formol a 37% (0,4%); sabão; óleo de pinho; solvente; corante), inibiu o embrionamento dos ovos desse parasita e que dois detergentes Dt6 (Linear alquil benzeno sulfonato de sódio) e Dt15 (tensoativos 2,0-2,5%) reduziram em mais de 50% a eclosão dos ovos. As demais soluções não apresentaram eficiência significativa.



Tabela 3 – Características dos produtos detergentes e desinfetantes testados por Massara e colaboradores (2003).

Código do produto	Componente ativo indicado	Diluição sugerida	Tempo de exposição sugerida	Atividade indicada
Ds1	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 50% (0,85%)	Puro	10 minutos	Desinfetante
Ds2	Cloreto de n-alquil dimetil benzil amônio a 80% (1,25%); formol inibido a 37% (0,25%)	Puro	10 minutos	Antimicrobiano
Ds3	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 100% (0,75%)	Puro	10 minutos	Bactericida e germicida
Ds4	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 100% (0,75%)	Puro	10 minutos	Bactericida
Ds5	<b>Orto-benzil para-clorofenol 0,75%; formol a 37% (0,4%); sabão; óleo de pinho; solvente; corante*</b>	<b>Puro</b>	<b>10 minutos</b>	<b>Germicida e bactericida</b>
Dt6	<b>Linear alquil benzeno sulfonato de sódio</b>	<b>Puro</b>	<b>Não indicado</b>	<b>Detergente instantâneo</b>
Dt7	Linear alquil benzeno sulfonato de sódio	Puro	Não indicado	Limpador
Dt8	Dodecil benzeno sulfonato de sódio linear	2-3 tampas/L (55-82,5mL/L)	Não indicado	Limpador concentrado
Ds9	Hipoclorito de sódio (cloro ativo: 2,0 a 2,5%); hidróxido de sódio; cloreto de sódio*	1 colher de chá (2mL)/5L	10 minutos	Germicida e bactericida
Ds10	Hipoclorito de sódio (cloro ativo: 2,0 a 2,5%); carbonato de sódio; cloreto de sódio; hidróxido de sódio*	1 colher de chá (2mL)/5L	10 minutos	Germicida e bactericida
Ds11	Vinagre de vinho branco	Não indicado	Não indicado	Não indicado **
Dt12	Tensoativo aniônico	Puro	Não indicado	Limpeza geral
Ds13	Fosfato de sódio; lauril sulfato de sódio; azeite de toronja; agente de controle de qualidade*	10g/L	5 minutos	Limpador e desinfetante para frutas e verduras
Ds14	Quarternário de amônio a 80% (3,26%)	Puro	10 minutos	Bactericida e germicida
Dt15	<b>Tensoativos</b>	<b>2-5%</b>	<b>2 a 24 horas</b>	<b>Detergente</b>
Ds16	Soluto de formaldeído; formol a 37% 20mL; N-duodecilbenzeno sulfonato de sódio (a 12%) 6,67mL; essência de eucalipto 0,4mL *	Puro	10 minutos	Germicida desinfetante bactericida

\* Componente ativo não indicado.

\*\* Atividade popularmente reconhecida como desinfetante para frutas e verduras.

Fonte: (MASSARA *et al.*, 2003).

Tais estudos mostram a variedade de produtos que podem ser utilizados na desinfecção de vegetais, porém poucos relatam à eficácia dos detergentes próprios para alimentos quanto ao poder de remoção de bactérias, parasitas, artrópodes e de outras formas de “vida livre”.

Os resultados quanto à eficiência dos produtos desinfetantes e detergentes para alimentos, encontrados por vários autores, tornam-se difíceis de serem conclusivos e, portanto, Silva *et al.* (2003) enfatizam a necessidade em seguir métodos padronizados para essa determinação.

### 3.5 Patógenos em hortaliças: coliforme fecais, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp

As hortaliças que são consumidas cruas podem ser veículos de agentes etiológicos que causam enfermidades entéricas, quando contaminadas por enterobactérias, helmintos e protozoários. A gravidade epidemiológica se dá principalmente pela resistência de bactérias, cistos e oocistos de protozoários, ovos, larvas e ou formas adultas de helmintos e artrópodes (GERMANO; GERMANO, 2008; JAY, 2005).

Para conhecer as condições sanitárias dos alimentos utiliza-se análise microbiológica a fim de identificar microrganismos indicadores. Estes, por sua vez, são definidos como grupos ou espécies de microrganismos que quando presentes nos alimentos podem indicar as condições sanitárias no processamento ou contaminação de origem fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Para que um grupo de microrganismos ou espécie seja considerado como indicador deve apresentar características mínimas, como por exemplo: serem facilmente distinguível de outros microrganismos presentes na microbiota do alimento e sua presença também deve indicar o patógeno que vive associado; no entanto, não poderá estar presente como contaminante natural, pois sua detecção indicará um falso-positivo (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são utilizadas como indicadoras sanitárias dos processos de produção do alimento e, caracterizam-se por serem gram-negativas, não produtoras de esporos, anaeróbias facultativas e oxidase negativa. Dentro desta família encontram-se os coliformes totais ou coliformes a 35°C e os coliformes termotolerantes ou coliformes fecais, que também são denominados indicadores da qualidade higiênico-sanitária. Também fazem parte das enterobactérias várias bactérias patogênicas para plantas e animais, como a *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Citrobacter freundii*, *Shigella* e *Salmonella* (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA *et al.*, 2010 )

Assim, os microrganismos que fazem parte do grupo dos coliformes totais, quando encontrados nos alimentos não indicam necessariamente contaminação fecal, por que a maioria também é encontrada no ambiente (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Os coliformes fecais taxonomicamente compreendem um subgrupo dos Coliformes totais e incluem apenas as espécies bacterianas capazes de fermentar a lactose a 45°C em 24h. Compõe este subgrupo as enterobactérias que até pouco tempo acreditava-se serem provenientes do trato intestinal, porém sabe-se que a maioria é de origem não-fecal, com exceção da *Escherichia coli* e, portanto, esse termo fecal vem sendo substituído por termotolerantes (SILVA, *et al.*, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE 2005).

Porém, a detecção de coliformes fecais nos alimentos, subentende que a *E.coli* encontra-se presente. Este microrganismo foi determinado como indicador de contaminação fecal em água desde 1892 e, posteriormente, estendeu-se para os alimentos, devido sua característica de habitar o trato intestinal e por ser encontrado no meio ambiente. A *E. coli* sobrevive, cresce e estabelece populações em ambientes naturais como lagos, rios, águas residuárias, águas do mar poluídas (GERMANO; GERMANO, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

A RDC Nº12 de 2001 (BRASIL, 2001) apresenta os padrões microbiológicos para os alimentos, delimitando os valores máximos permitidos. Tanto para as hortaliças frescas in natura como para aquelas que foram preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) e sanificadas, especificando: *Samonella sp.*, que deve ser ausente em 25g da amostra e coliformes fecais com número máximo de 102/g.

### 3.5.1 *Escherichia coli*

Pertence a família *Enterobacteriaceae* e possui vários tipos antigênicos, chegando aproximadamente a mil. O sorotipo é definido pelos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K). Caracteriza-se ainda, por ser gram-negativa, não produtora de esporos, capaz de fermentar a lactose produzindo gás e ácido. São mesófilas e desenvolvem-se em temperatura ótima de 37°C embora existam cepas capazes de se multiplicar a 4°C; são termosensíveis, ou seja, são destruídos em temperaturas acima de 60°C em pouco tempo, porém podem sobreviver a longos

períodos sob baixas temperaturas; e são anaeróbias facultativas. (GERMANO; GERMANO, 2008)

Sua presença nos alimentos *in natura* pode indicar contaminação de origem fecal e, conseqüentemente, pode-se afirmar que estes estão em condições higiênicas indesejáveis. (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Algumas linhagens são patogênicas ao homem: EPEC (*E. coli* patogênica clássica) que acomete recém-nascidos e lactantes; EIEC (*E. coli* enteroinvasiva) que acomete jovens e adultos; ETEC (*E. coli* enterotoxigênica) que provoca diarreia infantil e dos viajantes; EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) que também acomete crianças e idosos porém com um quadro de gravidade mais severa; e a EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa) que causa quadros crônicos de diarreia em adultos. (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GERMANO; GERMANO, 2008)

Dentre as cepas de *E.coli* (EHEC), a de maior importância para as autoridades de saúde é o sorotipo O157:H7, responsável por infecções enterohemorrágicas. Por outro lado a EIEC e ETEC também são muito documentadas como causadoras de surtos alimentares. É válido destacar que, quando o homem tem contato com várias cepas patogênicas, após sucessivas infecções passa a ser portador destas sendo veículo de contaminação para o ambiente, alimentos e para outras pessoas susceptíveis (JAY, 2005).

Os alimentos comumente contaminados pela *E. coli* incluem a água, quando contaminada por dejetos fecais devido ao despejo de esgotos em rios, lagoas, lagos e outros; alimentos *in natura* contaminados via água de irrigação, solo contaminado ou manipulador portador da bactéria. A carne de hambúrguer (moída) mal cozida é o principal causador de infecções pela cepa de *E. coli* O157:H7. Sabe-se que o leite pode veicular cepas EHEC e EIEC, conforme surtos de toxinfecção notificados. Sucos de frutas não pasteurizados também podem veicular *E. coli* EIEC. (GERMANO; GERMANO, 2008).

Os produtos de origem vegetal que são consumidos crus podem ser de grande risco, caso sejam provenientes de cultivo que recebeu irrigação com águas contaminadas com coliformes fecais, bem como adubo contaminado por *E. coli*. Germano e Germano (2008) cita que os vegetais minimamente processados são comumente contaminados por coliformes fecais e *E. coli* e que, dependendo da sua contagem interferem até no seu valor nutricional.

### 3.5.2 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* é considerado por Jay (2005) como um dos principais agentes de patologias em humanos devido a sua frequência em casos de surtos alimentares diagnosticados.

São *Enterobacteriaceae* e caracterizam-se por serem bastonete gram-negativas, não produtoras de esporos, anaeróbias facultativas, oxidase negativa, catalase positiva e redutores de nitratos a nitritos (SILVA *et al.*, 2010).

Dentre as cepas mais envolvidas com patologia humana está a *S. enteritidis enterica*, que é considerada o principal foco nas análises de alimentos e sua resposta bioquímica aos testes são tomados como típicos nos ensaios, por exemplo: não fermentam a lactose nem a sacarose, mas a glicose produzindo gás; produzem ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S); não produzem uréase; fermentam o dulcitol; utilizam citrato e não o malonato; nem produzem indol e nem a enzima B-galactosidase (JAY, 2005).

*S. enteritidis sub sp. enterica*, antes chamada de *S. cholerasuis* devido as divergências na nomenclatura, possui cerca de 2.460 sorotipos, que baseiam-se na sua estrutura antigênica dividindo-os em antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsular (Vi) que circunda a parede celular (JAY, 2005).

Podem se desenvolver facilmente nos alimentos, por não serem exigentes para se multiplicarem, seja em água contaminada, restos de alimentos, ou fezes e outros. Localizam-se primordialmente no trato intestinal das aves em geral, de mamíferos domésticos e silvestres. Muitas vezes não provocam sintomas ao seu hospedeiro (GERMANO; GERMANO, 2008; JAY, 2005).

Os alimentos envolvidos com a contaminação por *Salmonella* sp. compreendem aqueles ricos em proteínas e com alto teor de umidade, citando-se leite e derivados, ovos e produtos a base destes (maionese, pudim, gemada), carne de aves, bovina e suína, pescados, alguns alimentos de origem vegetal como coco, cacau, suco de laranja não pasteurizado e hortaliças cruas manipuladas (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005).

Germano e Germano (2008) citam uma pesquisa realizada em hortaliças e frutas minimamente processadas, comercializadas no Ceará, as quais estavam

contaminadas por *Salmonella* sp., isso em 66% das amostras de hortaliças e 26% das amostras de frutas.

Devido sua ação patogênica ao organismo humano este microrganismo deve estar ausente nos alimentos, como recomenda a legislação (BRASIL, 2001). Sua transmissão pode acontecer em um ciclo envolvendo o homem e os animais e pelas fezes, água e alimentos, principalmente vegetais que foram submetidos a irrigação com reservatórios contaminados, fertilizante contaminado com matéria fecal e manipulador portador sintomático ou assintomático (JAY, 2005).

### **3.6 Protozoários, helmintos e artrópodes**

Entre os contaminantes de hortaliças e outros alimentos que provêm do solo, além das bactérias podemos encontrar uma gama variada de formas de vida, entre os seres eucariontes, destacando-se algas, fungos, protozoários, helmintos anelídeos, artrópodes e outros (NEVES, 2005).

Protozoários, helmintos e artrópodes são encontrados em abundância no solo e em ambientes aquáticos, como organismos de vida livre ou em associação simbiótica com outros seres vivos, mantendo relações mutualistas, parasitárias ou comensais. Aqui particularmente, vão nos interessar aqueles que podem parasitar plantas e animais, e em destaque o homem (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003).

O parasitismo é definido como a associação entre organismos de espécies diferentes (simbiose), onde o parasito habita no seu hospedeiro, de forma temporária ou permanente. O parasito é o único a tirar proveito da convivência, em detrimento do hospedeiro. Na relação parasito-hospedeiro, o último funciona como reservatório e, às vezes, também como vetor do primeiro, que geralmente passa por mais de um estágio morfofuncional em diferentes etapas do seu ciclo biológico. Para completar seu ciclo evolutivo, o parasito pode necessitar de mais de um hospedeiro – intermediário(s) e definitivo. Numa determinada etapa da vida alguns podem ser muito restritivos quanto à espécie de hospedeiro, quando são estenoxenos; ou ao contrário, quando são eurixenos, podendo aceitar variadas espécies hospedeiras (REY, 2008; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Os parasitos do homem estão entre os protozoários (eucariontes unicelulares - Protozoa), platelmintos (vermes de corpo achatado – Cestoda e Trematoda), nematódeos (vermes com corpo roliço) e artrópodes (insetos, ácaros, dentre outros). Alguns deles permanecem no hospedeiro durante toda sua vida; outros possuem etapas de “vida livre”, onde o desenvolvimento de alguns estágios, geralmente juvenis, se dá no ambiente. Os parasitos do homem costumam também ser agrupados conforme o seu modo de transmissão. O mecanismo mais frequente de infecção ocorre pela via oral, com ingestão de água ou alimentos contaminados, contato da boca com as mãos sujas de terra ou de resíduos fecais contendo formas parasitárias, ingestão ou inalação de poeira. A penetração transcutânea ativa de larvas presentes em solos ou água, também é um meio importante de transmissão de helmintos; outra forma de transmissão é pelo contato direto entre pessoas ou através de fômites (este é um mecanismo que também pode potencializar a via oral); a transmissão por intermédio de vetores (artrópodes ou moluscos) é a principal forma de transmissão de hemoparasitos. Por fim, outros mecanismos como a transfusão de sangue ou o transplante de órgãos também contribuem para a transmissão de parasitos ao homem (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003; NEVES, 2005; REY, 2008).

### 3.6.1 Protozoários

Protozoários são seres unicelulares sem parede celular rígida e geralmente são microscópicos. Utilizam variados meios de locomoção: através de estruturas especializadas como cílios e flagelos, emissão de pseudópodes, flexão e deslizamento auxiliados por microtubulos subpeliculares. Reproduzem-se de forma assexuada (divisão binária ou múltipla, brotamento e outros mecanismos) e /ou sexuada (conjugação e fecundação). Para obter seu alimento, protozoários de “vida livre” são predadores de bactérias e outros microrganismos; os simbioses – parasitas, comensais ou mutualistas – se alimentam em seus hospedeiros (ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Muitos protozoários, tanto os de vida livre como os que vivem em hospedeiros, podem secretar um revestimento resistente e entrar num estágio de

resistência, o cisto. Este processo é particularmente comum nos parasitos intestinais de vertebrados, representando um mecanismo importante para dar continuidade ao ciclo evolutivo. No caso de certos protozoários parasitos que se reproduzem por fecundação (os coccídios), após a formação do zigoto (“ovo”) ocorre um aparente “encistamento”, e a forma resultante é chamada de oocisto (ou ovocisto). Não estão totalmente claras as condições que levam ao encistamento, supondo-se que ele seja desencadeado por eventos ambientais adversos, como a dessecação, deficiência de nutrientes, mudanças na concentração de oxigênio, pH ou temperatura. Durante o processo, uma parede cística é secretada e material de reserva é estocado, além de geralmente ocorrer uma ou mais divisões nucleares que tornam o cisto multinucleado. O desencistamento acontece quando os cistos voltam às condições ambientais favoráveis, como a chegada ao intestino de um novo hospedeiro após ingestão. Para isso pode ocorrer secreção de enzimas líticas pelo protozoário, ação de enzimas digestivas do hospedeiro sobre a parede cística e absorção de água, levando o cisto ao rompimento e reativação de vias metabólicas da forma vegetativa (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Protozoários estão amplamente distribuídos na natureza, especialmente no solo e água, onde a maioria é de “vida livre”. Muitas espécies não foram ainda identificadas ou estudadas (REY, 2008).

De forma sucinta é apresentada a classificação mais usual dos parasitos do homem, segundo Neves (2005), Rey (2008), Robert e Schmidt (2005), os quais estão em 4 Filos do sub-reino Protozoa, Reino Protista:

- Sarcomastigophora: protozoários que se locomovem através de flagelos, cílios ou pseudópodes; a reprodução é por divisão binária. No sub-filo Mastigophora estão os flagelados, e no sub-filo Sarcodina, os amebídeos

- Apicomplexa: protozoários que possuem complexo apical, organela necessária à penetração em células, já que todos são parasitos intracelulares obrigatórios. Sofrem reprodução sexuada e assexuada, alternadamente. Os que têm importância médica estão na classe Sporozoa, incluindo os coccídios intestinais

- Ciliophora: protozoários ciliados que possuem macro e micronúcleos e realizam reprodução sexuada por conjugação e assexuada por divisão binária transversal; uma única espécie – o *Balantidium coli* – pode, raramente, parasitar o intestino humano.



- Microsporida: são os microsporídios, protozoários parasitos intracelulares que se multiplicam através de “esporos” contendo o típico “filamento polar”. Este filo contém numerosas espécies (mais de 1200, em cerca de 150 gêneros) que parasitam a maioria dos invertebrados e todas as classes de vertebrados. No homem, passaram a ser encontrados frequentemente após a emergência da AIDS, muitas vezes causando infecções entéricas. Para serem identificados, os “microsporídios” requerem técnicas especiais, não sendo possível visualizá-los através dos métodos rotineiros de exame.

Entre os parasitas intestinais do homem os mais freqüentes estão entre os amebídeos, flagelados e coccídeos. No intestino humano, várias espécies de amebas podem ser encontradas como comensais (ex. *Entamoeba disp..ar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba butschilii* e *Endolimax nana*), e apenas uma como patogênica, a *E. histolytica*. Estas amebas, no entanto, compartilham muitas semelhanças morfológicas entre si, com amebas parasitas de outros animais e até mesmo com as amebas de “vida livre” (PESSOA; MARTINS, 1988; REY, 2008; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Dentre os flagelados, várias espécies habitam o intestino humano: *Chilomastix mesnili*, *Enteromonas hominis*, *Retortomonas intestinalis*, *Pentatrichomonas hominis* e *Giardia duodenalis*. Contudo, apenas a última é patogênica; além do homem, vários animais domésticos (como cães, gatos, bovinos e carneiros) e animais silvestres são hospedeiros de *Giardia* (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003; MONIS; CACCIO; THOMPSON, 2008).

Dos coccídeos intestinais do homem, *Isosp..ora belli* é conhecida há muito tempo como patógeno raro, porém sua prevalência exarcebou-se com o surgimento da AIDS e outras imunodeficiências. Pelo mesmo motivo, *Cryptosporidium sp.* é hoje reconhecido como patógeno do homem. Várias espécies do gênero *Cryptosporidium sp* são há muito tempo reconhecidas como parasitas do epitélio intestinal de mamíferos, aves, répteis e peixes. No homem, o seu reconhecimento difundiu-se a partir da década de 80, porque desenvolveram-se técnicas especiais capazes de identificá-lo nas fezes. Hoje a criptosporidiose é uma infecção entérica considerada entre as mais frequentes do homem, principalmente em crianças. Os oocistos de *Cryptosporidium sp.* são extremamente resistentes, inclusive ao cloro, o que resulta em sua maior permanência e dispersão no meio ambiente (AMATO NETO, 2008; FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003).

Vários fatores favorecem para a transmissão desses protozoários a partir da contaminação fecal do meio por cistos e oocistos e sua veiculação pela água e alimentos, principalmente vegetais crus. A disseminação de *Giardia* e *Cryptosporidium* ainda recebe a contribuição adicional das fezes de outros animais reservatórios, além dos dejetos humanos. Ambos, além de serem extremamente resistentes ao cloro e outros desinfetantes, dispersam-se facilmente através da água, chegando a contaminar até mesmo os estuários de rios e praias litorâneas (FAYER, DUBEY, LINDSAY, 2004).

### 3.6.2 Helmintos

Os helmintos em geral estão amplamente distribuídos na natureza, ocupando ambientes terrestres e aquáticos, nos diferentes climas da Terra, em regiões rurais ou urbanas. Compreendem espécies que vivem em “vida livre” ou em simbiose, parasitando vegetais e animais, desde os invertebrados mais simples até o homem (MCSORLEY, 2009; REY, 2008).

Realizam reprodução sexuada, sejam eles hermafroditas ou dióicos (=dioécios, ou seja, com sexos separados); assim produzem ovos, sendo as espécies ovíparas ou ovovivíparas. Crescem, após a eclosão dos ovos, passando por estágios juvenis (larvas – que recebem nomes específicos), atingindo finalmente o(s) estágio(s) adulto(s). Entre os helmintos parasitos, alguns necessitam de apenas um hospedeiro para a realização do seu ciclo evolutivo – são monoxênicos –, outros dependem de dois ou mais hospedeiros, quando são heteroxênicos (ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Os helmintos parasitos do homem estão entre os metazoários dos filos Platyhelminthes – os vermes de corpo achatado – pertencendo às classes Cestoda (que tem forma de fita) e Trematoda (em forma de folha), ou do filo Nematoda, que contem os vermes roliços. Poucas espécies são do filo Acanthocephala, mas não ocorrem no Brasil. Algumas espécies de helmintos que são parasitas habituais de animais, podem acidentalmente chegar ao ser humano, causando-lhe doença (NEVES, 2005; REY, 2008).

### 3.6.2.1 Platyhelminthes

São os animais mais simples a apresentarem simetria bilateral, sendo triploblásticos<sup>4</sup>. São acelomados<sup>5</sup>, com tubo digestivo incompleto ou mesmo ausente; também não possuem um sistema respiratório, e sua respiração ocorre por difusão do oxigênio através do tegumento externo. A maioria dos platelmintos são de vida livre (Turbellaria), conhecidos como “planárias”, que são encontradas nos oceanos, em águas frescas e na maioria dos *habitats* terrestres. Os platelmintos parasitos são a minoria no grupo, pertencendo às já mencionadas classes Cestoda e Trematoda. (MYERS, 2004; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

### 3.6.2.2 Cestódeos

Nos Cestoda o corpo achatado tem forma de “fita” e possuem órgãos de fixação (ventosas, acúleos e outras) na extremidade anterior do corpo, ou seja, num escólex. Variam bastante em tamanho, algumas espécies medindo poucos milímetros (ex. *Echinococcus*), e outras chegando a atingir alguns metros (ex. *Taenia*), porém todas, geralmente, apresentam a mesma estrutura. São hermafroditas, tendo o corpo segmentado em “anéis” ou “proglotes” dotadas quase exclusivamente de órgãos reprodutores masculinos e femininos, com níveis crescentes de maturidade reprodutiva que culmina com as proglotes grávidas. Esses vermes não possuem o aparelho digestivo, e suas trocas nutritivas com os hospedeiros se dão por osmose (CASTRO, 2011; NEVES, 2005; REY, 2008; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Os cestódeos que parasitam o tubo digestivo do homem, encontrados no Brasil, pertencem aos gêneros *Taenia* (*T. solium* e *T. saginata*) e *Hymenolepis* (*H. nana*). Os primeiros necessitam de hospedeiros intermediários, respectivamente o

---

<sup>4</sup> Corpo constituído por três camadas embrionárias: ectoderme, mesoderme e endoderme.

<sup>5</sup> Celoma – cavidade interna revestida por um tecido originado a partir do mesoderma. Acelomado não apresenta essa cavidade.

porco e o boi, para completarem seus ciclos de vida; já *H. nana* pode realizar todo o seu ciclo no homem, porém alternativamente o realiza também através de um artrópode como hospedeiro intermediário. O homem parasitado pelo verme adulto elimina nas fezes os ovos desses vermes (os de *Taenia*, nas proglotes), que vão contaminar os hospedeiros intermediários, ou o próprio homem (neste caso, *T. solium* vai ocasionar a cisticercose humana). O ambiente torna-se uma fonte importante de ovos de tênias que, sendo bastante resistentes, podem persistir viáveis por longo tempo (GASPARINI; POTECLA, 2004; REY, 2008).

### 3.6.2.3 Trematódeos

Nos Trematoda os órgãos de fixação são a ventosa oral e o acetábulo (ventosa ventral); esses vermes têm forma de folha, são geralmente hermafroditas e possuem aparelho digestivo incompleto. Na família *Schistosomatidae* estão espécies dióicas, onde os machos conservam o aspecto foliáceo “enrolado” formando fenda – o canal ginecóforo – que abriga as fêmeas. As formas adultas desses trematódeos habitam vertebrados, ao passo que as formas juvenis se desenvolvem, por poliembrionia, em moluscos aquáticos hospedeiros intermediários (CASTRO, 2011; MYERS, 2009; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

No Brasil, encontram-se os trematódeos parasitos do homem *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica* (que parasita principalmente bovinos). Ambos dependem da veiculação fecal dos ovos para a contaminação do ambiente aquático, e conseqüentemente, dos hospedeiros intermediários (AMATO NETO, 2008; REY, 2008).

### 3.6.2.4 Nematódeos

Entre os invertebrados, os Nematoda constituem o segundo filo mais rico em espécies e bastante abundante na face da Terra, sendo superado apenas pelos artrópodes. Ocorrem em praticamente todos os *habitats* da Terra, dos oceanos aos

mais variados ambientes terrestres e de água doce, silvestres, rurais ou urbanos. Estima-se a existência de mais de um milhão de espécies, no entanto acredita-se que não mais que 80.000 delas já foram descritas – menos de 10% do total estimado (MYERS, 2001; MACSORLEY, 2009).

Muitos desses helmintos são parasitos de plantas e de animais, inclusive do homem – quase todos os organismos metazoários conhecidos foram encontrados parasitados por nematódeos –, podendo lhes causar doenças. No entanto, a imensa maioria dos Nematodeos é de vida livre, ocorrendo em abundância nos ambientes colonizados, graças a vários tipos de adaptações que lhes permitem enfrentar desde o congelamento, até o estresse hídrico, podendo viver nos diversos tipos de solo. Já foram encontrados quase 100.000 indivíduos em uma única maçã podre e, em um metro quadrado de solo de boa qualidade, contam-se milhões na camada mais superficial (MYERS, 2001; MACSORLEY, 2009).

Os nematódeos de vida livre presentes no solo têm participação fundamental na decomposição da matéria orgânica e na reciclagem de nutrientes, processos essenciais ao sucesso da agricultura (GUPTA; NEATE; LEONARD, 2001; NEIL, 2004; NEHER, 1999). Além disso, participam de outros importantes processos ecológicos, sendo considerados eficientes bioindicadores de alterações ocorridas no solo. Atualmente vários pesquisadores no mundo buscam identificar as comunidades de nematódeos presentes no solo, a fim de monitorar o estado ecológico do mesmo (LIANG *et al.*, 2005).

Os nematódeos possuem corpo alongado, cilíndrico e são geralmente dióicos, com dimorfismo sexual onde o macho tende a ser menor que as fêmeas. A maioria deles são razoavelmente pequenos, medindo cerca de um milímetro de comprimento no caso dos de vida livre; os que parasitam o homem variam de 1 milímetro, como o *Strongyloides stercoralis*, a um metro de comprimento, caso do filarídeo *Dracunculus medinensis* (NEIL, 2004; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Nematódeos são organismos pseudocelomados, podendo-se comparar sua estrutura à de um tubo contendo outro no seu interior; o tubo externo corresponde ao revestimento coberto pela cutícula, e o interno representa o tubo digestivo, formado por uma cavidade bucal, esôfago e um longo intestino, que termina numa cloaca (aparelho digestivo completo). Entre os tubos externo e interno, localizam-se o aparelho reprodutor e outras estruturas (NEIL, 2004; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

O hábito alimentar de um nematódeo pode ser caracterizado por aspectos da sua abertura bucal (que possui lábios e outras estruturas - cerdas, espinhos), pela fonte do alimento e seu *habitat*. Exemplificando, os nematódeos de vida livre podem ser distinguidos em bacterívoros – a maioria, que se alimenta de bactérias abundantes no solo –, fungívoros, algívoros e predadores, que alimentam-se respectivamente de fungos, algas e de outros nematódeos (MCSORLEY, 2009). Esta classificação é particularmente útil aos ecologistas para compreenderem a posição dos nematódeos nas cadeias alimentares do solo e seu papel benéfico na decomposição da matéria orgânica (LIANG *et al.*, 2005; GUPTA; NEATE; LEONARD, 2001; NEHER, 1999; TOMAZINI, FERRAZ; MONTEIRO, 2008).

A cutícula, que reveste todo o corpo, contém colágeno e é um elemento central na organização desses vermes. Com grande capacidade de crescimento, ela é trocada durante o desenvolvimento, que se dá por quatro “mudas” ou ecdises; as larvas L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub> sucedem-se a cada muda (Figura 1). Nas espécies parasitas, L<sub>3</sub> geralmente é a forma infectante para o homem. L<sub>5</sub> resulta da quarta muda e é um “adulto jovem”, que ainda cresce até alcançar a maturidade. Geralmente a cutícula tem estrias transversais e origina outras estruturas do corpo, como expansões laterais ou caudais, cápsula bucal, faringe, poro excretor, vulva, cloaca, bolsa copuladora, espículos, etc; certos ornamentos da cutícula são característicos de nematódeos parasitos de plantas e de algumas espécies de vida livre. Apesar de sua complexidade, a cutícula dos nematódeos é permeável à água e aos gases, com a respiração se efetuando através dela (NEIL, 2004; ROBERT; SCHMIDT, 2005). As estruturas derivadas da cutícula, principalmente os caracteres sexuais presentes nos estágios adultos, possuem aspectos peculiares utilizados na identificação e classificação desses vermes, assim como as suas relações filogenéticas (DE LEY, 2006; KIONTKE; FITCH, 2006).

Alguns nematódeos parasitos são heteroxênicos, realizando seus ciclos vitais em hospedeiros intermediário e definitivo. As filárias são transmitidas ao homem por artrópodes hematófagos e se desenvolvem nas vias sanguíneas e linfática ou em tecidos do hospedeiro, não apresentando maior interesse no presente trabalho (NEVES, 2005; REY, 2008).

A maioria dos nematódeos parasitos são monoxênicos, habitando o aparelho digestivo de seus hospedeiros. Os nematódos intestinais do homem são em geral geohelmintos, isto é, vermes que necessitam desenvolver no solo, em

etapa de vida livre, alguns de seus estágios evolutivos, até chegarem à forma infectante para o hospedeiro. Estes helmintos são o *Ascaris lumbricoides* e o *Trichuris trichiura*, transmitidos ao homem por via oral quando ele ingere ovos larvados, além dos ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*) e do *Strongyloides stercoralis*, estes transmitidos por penetração de larvas na pele. Independentemente do modo de transmissão, ovos ou larvas destes vermes chegam ao meio ambiente com as fezes do homem e amadurecem no solo até tornarem-se infectantes. O *Enterobius vermicularis* é uma exceção entre os nematódeos intestinais do homem, por não ser um geohelminto (AMATO NETO, 2008; GASPARINI; PORTELLA, 2004; REY, 2008).

A Figura 1 foi elaborada para permitir uma comparação entre os ciclos biológicos dos nematódeos intestinais do homem, individualmente, e dos nematódeos de vida livre, em geral, evidenciando a sucessão de estágios evolutivos no meio ambiente e/ou no hospedeiro. Podemos observar os diferentes tempos necessários ao desenvolvimento dos geohelmintos parasitos no solo, quais são as formas excretadas nas fezes e as formas infectantes de cada um, assim como os mecanismos de transmissão ao homem.

Entre os nematódeos já identificados, a maioria refere-se às espécies parasitas – do homem ou de animais e plantas. Apenas uma pequena parte das espécies de vida livre, no universo estimado, já foi descrita. Muitas controvérsias existem na taxonomia desses invertebrados, porém segundo Blaxter e colaboradores (1998), o filo Nematoda foi dividido nas classes Adenophorea, com 8 ordens, e Secernentea, contendo 13 ordens. Na primeira, apenas a ordem Trichocephalida (*Trichuris trichiura* e outros) contem espécies parasitas do homem; na segunda, os parasitos humanos estão nas ordens Rhabtida (*Strongyloides stercoralis*), Strongylida (os ancilostomídeos), Oxyurida (*Enterobius vermicularis*) Ascaridida (*Ascaris lumbricoides*) e Spirurida – as filárias.

As ordens Rhabtida e Strongylida, além de alguns parasitos de animais e de vegetais, contêm numerosas espécies de vida livre, inclusive o *Caenorhabditis*

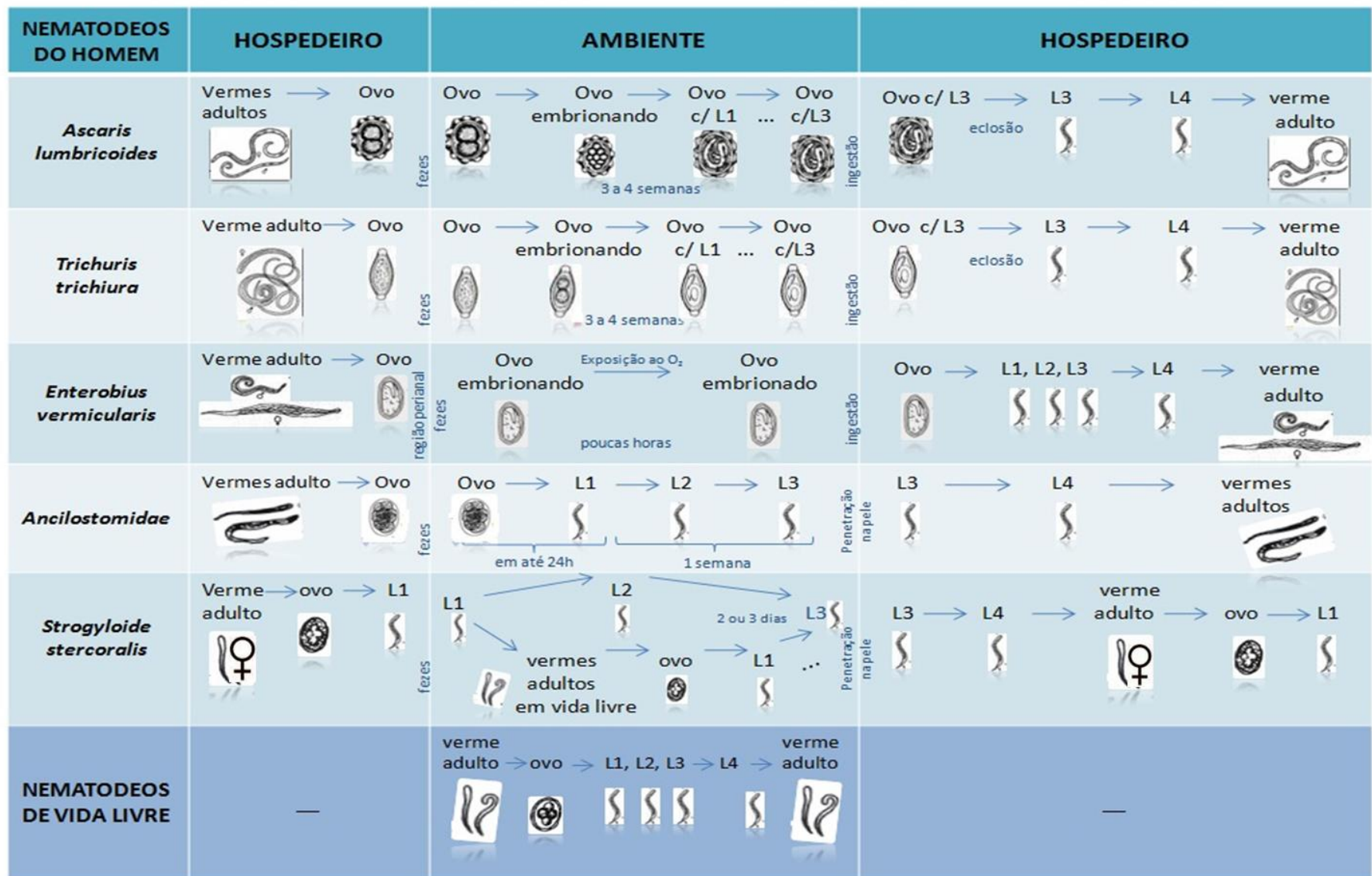


Figura 1 – Resumo comparativo dos ciclos de vida dos nematódeos parasitas do homem e dos nematódeos de vida livre. Fonte: Autoras.



*elegans*, nematódeo que tem sido largamente usado como modelo experimental de organismo metazoário (SOMMER *et al.*, 2006; STIERNAGLE, 2006). Morfologicamente, os membros destas duas ordens se assemelham bastante, sendo os gêneros e espécies diferenciados à microscopia ótica, quando possível, principalmente por aspectos dos machos e fêmeas adultos; muitas vezes a diferenciação é feita através de características fisiológicas ou até mesmo genéticas, dos vermes (DE LEY, 2006; KIONTKE; SUDHAUS, 2006).

Com base nas relações filogenéticas entre os Nematoda, estabelecida com base na sequência do DNA da sub-unidade ribossomal menor (SSU rDNA) de mais de 600 nematódeos cujos genomas foram seqüenciados, De Ley e Blaxter (2004) propõem nova classificação destes vermes. Nesta proposta, os Nematoda formam as classes Enoplea e Chromadoria, esta com todos os antigos Secernentea pertencendo à ordem Rhabditida, que se torna bastante ampliada e é então dividida em sub-ordens e infra-ordens.

### 3.6.3 Artrópodes

São animais metazoários, celomados, com simetria bilateral, que possuem exoesqueleto quitinizado, corpo segmentado e apêndices locomotores e alimentares articulados. Geralmente são dióicos e crescem por “mudas” ou “ecdises”. Dependendo dos estágios evolutivos encontrados no seu ciclo de vida, os artrópodes são considerados holometabólicos (estágios de ovo, larva(s), pupa e adulto), quando sofrem modificações morfológicas evidentes entre os estágios; ou paurometabólicos (estágios: ovo, ninfa(s) e adulto), quando seus estágios juvenis apresentam poucas alterações morfológicas entre si e em relação ao adulto (NEVES, 2005; MARCONDES, 2005).

Entre os artrópodes temos o maior número de indivíduos do Reino Animal (cerca de um milhão de espécies já descritas), mas especula-se que este número possa alcançar dezenas de milhões contando com as espécies ainda não descritas. Argumenta-se ainda, que a população de artrópodes no mundo corresponderia a 160 milhões de indivíduos para cada pessoa! Artrópodes são encontrados em todos

os ambientes da Terra, adaptando-se aos extremos de temperatura, salinidade, pressão, umidade ou ressecamento (MYERS, 2004).

A maioria é essencial aos processos ecológicos nos ambientes onde vivem e muitos deles são necessários à existência humana, nos fornecendo, direta ou indiretamente, alimentos, roupas, medicamentos e proteção contra outros organismos hostis. Neste universo, são poucas as espécies malélicas ao homem, constituindo as pragas da agricultura ou da Saúde Pública. Mesmo estas, certamente tornaram-se pragas em consequência da intervenção do próprio homem no meio ambiente, provocando desequilíbrio ecológico que favoreceu a reprodução e propagação de certas espécies. Isto se deu através de desmatamentos, monoculturas, criação intensiva de animais, superpopulação humana, acúmulo de águas poluídas, dejetos e lixo, construção de habitações precárias e maus hábitos higiênicos (BARNES; FOX; RUPPERT, 2005; MARCONDES, 2005; NEVES, 2005).

Os artrópodes são agrupados em cinco categorias: os **trilobitas** formam um grupo de artrópodes extintos, conhecidos apenas através de registros fósseis; os **miriápodes** (centopeias, lacraias); **os crustáceos**, que incluem lagostas, caranguejos, camarões, copépodes (microcrustáceos), cracas, tatuís; os **quelicerados**, que compreendem as aranhas, escorpiões, carrapatos e ácaros; e os **insetos ou hexápodes**, termo que se refere à presença de seis patas no adulto. Este grupo (classe Insecta) inclui várias ordens: *Diptera* - moscas, mosquitos (culicídeos), flebótomos, simulídeos ou borrachudos, maruins, mosquitos-pólvora, etc; *Hemiptera* - percevejos, barbeiros; *Siphonaptera* - pulgas; *Anoplura* – piolhos; *Hymenoptera* - formigas, abelhas; *Lepdoptera* - borboletas; e outras. Em vários destes grupos encontram-se espécies de interesse médico humano (MYERS, 2004).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção das amostras

Foram realizadas 30 coletas, obtendo-se unidade amostral igual a oito pés ou touceiras de alfaces (*Lactuca sativa* L.) *in natura*, variedade crespa, totalizando 240 amostras, onde:

- Dez coletas foram de cultivo convencional, obtidas em hortas, feiras, mercados e supermercados localizados na região metropolitana de Fortaleza.
- Dez coletas foram de cultivo orgânico, obtidas em um supermercado de revenda exclusiva deste tipo de produto, fornecidas de diferentes produtores da região de Guaraciaba do Norte-CE;
- Dez coletas foram de cultivo hidropônico, obtidas em supermercados de Fortaleza.

As amostras foram transportadas em sua embalagem original (sacos e sacolas de polietileno) a temperatura ambiente até o Laboratório de Preparo de Alimentos, do Departamento de Economia Doméstica, da Universidade Federal do Ceará.

As amostras foram higienizadas com detergente (diluído a 100ppm) e hipoclorito de cálcio (solução a 200ppm) recomendados para a lavagem e sanificação de hortifrutis, respectivamente. O detergente utilizado apresenta a seguinte composição: óleo de coco e soja, tensoativo não-iônico, material saponificante, tamponante, sequestrante, conservante e veículo aquoso, tendo como princípio ativo a associação de tensoativos. O tempo de ação do detergente foi de 3min e da solução clorada foi de 15 minutos.

### 4.2 Preparo das amostras

Foram utilizadas as boas práticas de manipulação visando evitar a contaminação da amostra.

Inicialmente as touceiras de alface foram pesadas uma a uma (1ª pesagem), anotando-se o peso a fim de obter valor do peso médio. Em seguida, foram desfolhadas e homogeneizadas. Realizou-se a 2ª pesagem conforme as análises: para análise microbiológica pesou-se o correspondente a 3 pés de alfaces e para análise parasitológica o equivalente a 1 pé de alface (Figura 2).

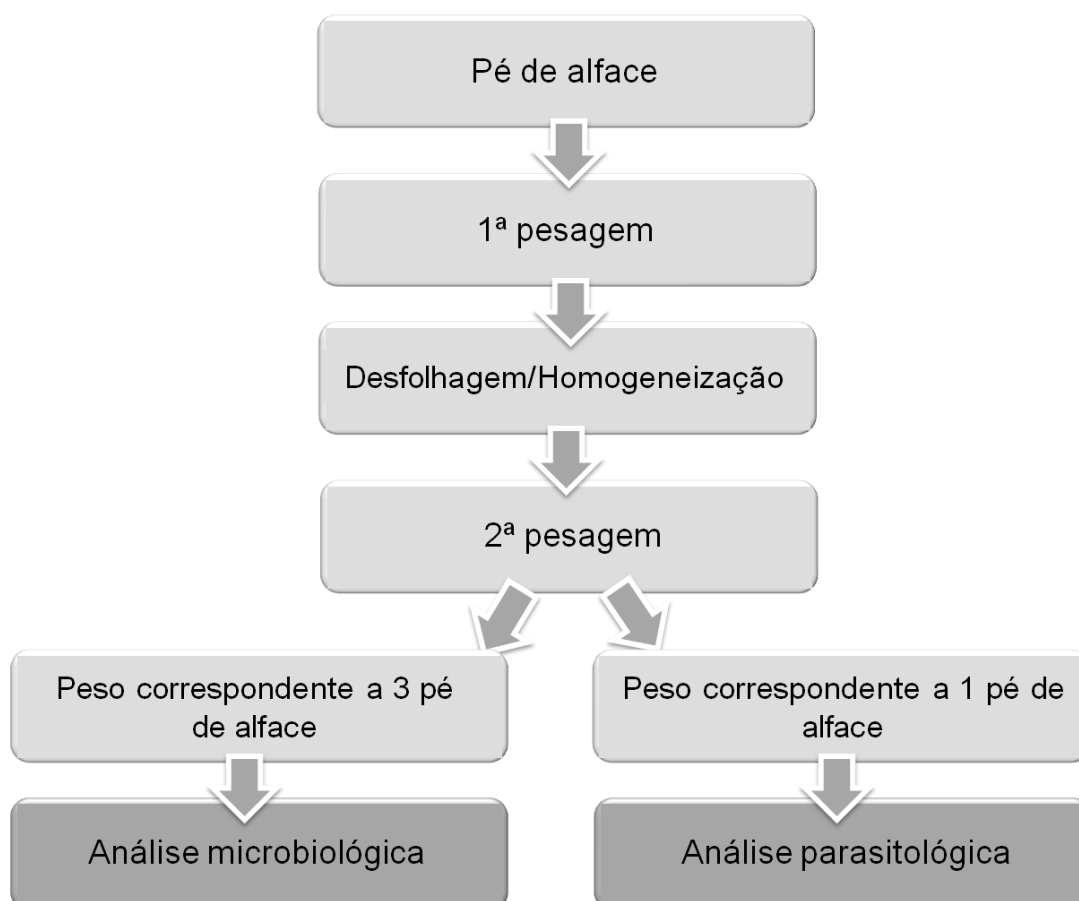


Figura 2 – Fluxograma do preparo das amostras.

### 4.3 Higienização das amostras

Em função do tipo de análise a ser realizada (Figura 2) as folhas de alfaces após pesagem foram submetidas a dois métodos de higienização designados de método teste e tradicional (Figura 3). Após cada etapa foram coletadas as amostras de alface em condições asépticas para análise microbiológica e amostras líquidas (água de pré-lavagem, água de enxágüe e as

soluções de detergente e sanitizante em que as alfaces foram imersas) para análise parasitológica.

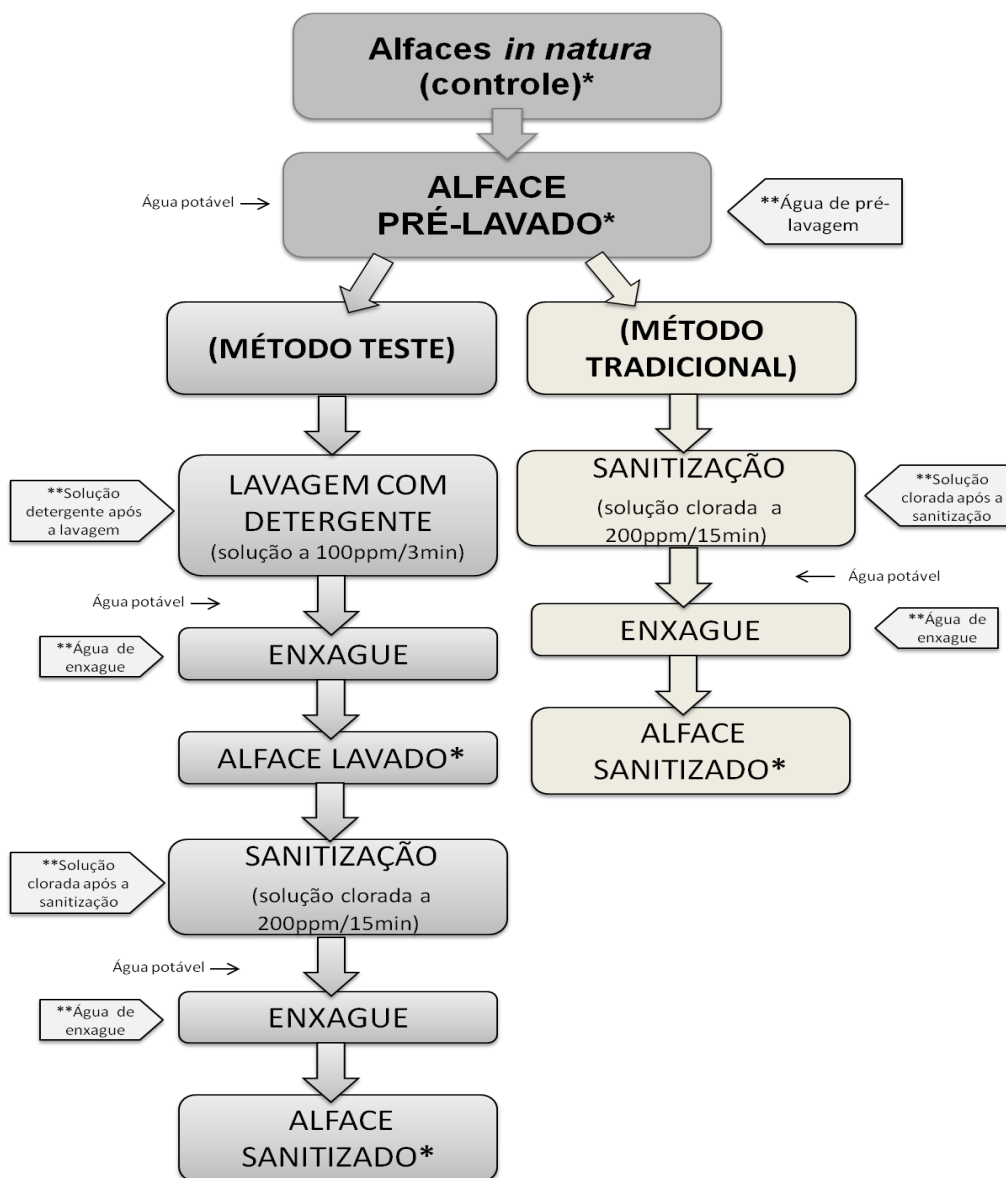


Figura 3 – Fluxograma dos métodos de higienização das alfaces e etapas de coletas de amostras para análises.

Controle: alface in natura submetida a pré-lavagem

Método teste: processo utilizando a solução de detergente e a solução clorada (200ppm)

Método tradicional: processo utilizando apenas solução clorada (200ppm)

\*Etapa da coleta das amostras de alface para análise microbiológica

\*\*Etapa da coleta das amostras líquidas para análise parasitológica

As amostras foram analisadas nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e ao de Parasitologia Humana, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.4 Análises microbiológicas

Foram realizadas as análises microbiológicas exigidas pela Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL,2001) ou seja, a determinação de coliformes fecais (NMP/g) e *Salmonella* sp/25g.

##### 4.4.1 Preparo das amostras para a análise de coliformes fecais

As amostras de alface (controle, método teste e método tradicional) foram cortadas e homogeneizadas com auxílio de utensílios estéreis. Foram transferidas 25g para frasco contendo 225mL de água peptonada (0,1%) estéril e a partir desta foi realizada as demais diluições decimais até  $10^6$  (APHA, 2001).

##### 4.4.2 Determinação do número mais provável de coliformes fecais (APHA,2001)

A partir de cada diluição retirou-se uma alíquota de 1mL, para uma série de três tubos contendo 10mL de caldo lauril sulfato triptose e tubos de Durham invertidos. Em seguida, foram incubados a 35°C por 24 a 48 horas e, decorrido este tempo, verificou se houve crescimento com produção de gás.

Uma alçada dos tubos de caldo lauril sulfato triptose com produção de gás foi inoculado na diluição correspondente em tubos contendo Caldo *E. coli* (EC) com tubos de Durham invertidos, e incubados em banho-maria a 45,5°C por 24h. Considerou-se positivo os tubos que apresentaram crescimento evidenciado pela produção de gás, Os resultados foram expressos em NMP/g da amostra, utilizando a tabela do número mais provável (NMP) para cada combinação de três tubos positivos e ou negativos.

#### 4.4.3 Pesquisa do gênero *Salmonella*

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada conforme metodologia descrita no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (FDA, 2007).

Inicialmente, pesou-se 25g das amostras que foram adicionados em 225mL de caldo lactosado, o qual foi incubado a 35°C por 18 a 24h, após a homogeneização. Em seguida realizou-se o enriquecimento seletivo, transferindo 0,1 mL da cultura do caldo de pré-enriquecimento para tubos com 10 mL de caldo Rappaport-Vassilidis modificado e 1 mL para tubos com 10 mL de caldo tetrionato. Os tubos contendo Rappaport-Vassilidis foram incubados em banho-maria a 42°C por 24 horas e aqueles contendo tetrionato em estufa a 35°C por 24 horas. Referidos tubos foram previamente homogeneizados por agitação para proceder ao plaqueamento seletivo, estriando uma alçada das culturas crescidas em ambos os caldos, em placa de Petri contendo ágar entérico de Hectoen (HE), ágar bismuto sulfito (BS) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 24h.

Após o tempo de incubação, as colônias com características típicas para *Salmonella* sp que desenvolveram nas placas contendo ágar HE, XLD e BS foram identificadas e selecionadas. E, com o auxílio de uma alça de inoculação tocou-se levemente sobre a massa celular no centro da colônia suspeita e inoculou-se em tubo contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) inclinado e tubo contendo ágar lisina ferro (LIA). Ambos foram incubados a 35°C por 24 horas.

As culturas com reações típicas para *Salmonella* sp. foram submetidas às provas sorológicas e bioquímicas seguindo as seguintes determinações.

##### a) Teste Sorológico

- Detecção dos antígenos somáticos (poli O) e flagelares (poli H): a partir da cultura de TSI incubada por 24h emulsionou-se uma alçada em 2mL de solução salina estéril (0,85%). Em uma placa de Petri, foi marcado dois quadrados de aproximadamente 2cm<sup>2</sup> com caneta esferográfica e ou lápis. Adicionou-se uma gota da cultura emulsionada em salina, colocando na parte superior do quadrado. Colocou-se uma gota da solução salina na parte inferior de um outro quadrado e emulsionou-se bem. Na parte inferior de outro quadrado foi adicionada uma gota do anti-soro somático polivalente anti-Salmonela e emulsionou-se bem. Segurando a

lâmina contra um fundo preto bem iluminado, movimentou-se delicadamente inclinando e rotacionando a lâmina observando se ocorria aglutinação no quadrado com anti-soro. Realizou-se a comparação com a aparência da emulsão no quadrado com salina (controle negativo), para não confundir a aparência turva da emulsão com reação de aglutinação (positivo). O mesmo procedimento foi utilizado para os antígenos flagelares (poli H).

b) Testes Bioquímicos

- Teste de Urease: transferiu-se uma alçada com inóculo da cultura de TSI, para caldo uréia de *Rustigian & Stuart* e incubou-se a 35°C por 24h. O teste foi considerado positivo quando houve modificação da cor inicial (“amarelo-pêssego”) para rosa escuro.

- Teste de Fermentação do Ducitol: transferiu-se uma alçada do inóculo da cultura de TSI para caldo vermelho de fenol suplementado com 0,5% de ducitol e incubado a 35°C por 48h. Considerou-se teste positivo, quando presenciou alteração da cor do meio, com ou sem produção de gás, de vermelho para amarelo, indicando a fermentação do ducitol por algumas espécies de *Salmonella*.

- Teste de Indol: uma alçada contendo inóculo retirado da cultura em TSI foi transferida para tubos contendo (5mL) caldo triptona 1%, que foram incubados a 35°C por 24h. Após incubação transferiu-se 5 ml da cultura para tubo estéril e adicionou-se 0,3mL do reagente de Kovacs em cada tubo. Considerou-se teste de indol positivo com a formação de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura.

- Teste de Malonato: a partir da cultura em caldo triptona inoculou-se três alçadas em caldo malonato modificado e foi incubado a 35°C por 48h. Foi considerado positivo quando se verificou a viragem do indicador para a cor azul, no entanto, para a maioria das *Salmonellas* este deve ser negativo.

- Teste de Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VM/VP): inoculou-se em caldo VM/VP, uma alçada da cultura presente em meio TSI e foi incubado a 35°C por 48h. Depois, transferiu-se 0,1mL da cultura para um tubo de ensaio (o restante do caldo VM/VP foi incubado) e adicionou-se 0,6mL de solução de  $\alpha$ -naftol 5% e logo em seguida acrescentou-se 0,2mL de solução de KOH 40%. O mesmo foi agitado para expor ao oxigênio. Após 10 a 15 minutos observou-se a formação de um anel vermelho devido à fermentação butilenoglicólica. *Salmonella* ssp. são VP negativas. Nos tubos contendo 5mL do caldo VM/VP restante, incubado por 96h,



adicionou-se 5 a 6 gotas do indicador vermelho de metila que imediatamente foi observado o resultado positivo quando o meio ficava vermelho. *Salmonelas* spp. são VM positivas.

- Teste de Citrato: transferiu-se uma alçada com inóculo da cultura TSI para ágar citrato de Simmons inclinado, picando no fundo e estriando por toda a rampa. Incubou-se a 35°C por 96h. Foi confirmado positividade para *Salmonella* sp. quando houve alteração da cor do meio de verde para azul. Algumas cepas são citrato negativas.

- Teste de crescimento em KCN: utilizou-se o caldo cianeto de potássio, que foi preparado em tubos com tampa de rolha recoberta de parafina. A partir da cultura reservada em Caldo Triptona 1%, inocularam-se três alçadas em um tubo contendo caldo cianeto de potássio. Flambou-se a boca do tubo, aquecendo para formar um selo de parafina ao tampar com a rolha. Em seguida, foram incubados a 35°C por 48h. A positividade do Teste foi observada a partir do crescimento (turvação do meio) da cultura após 24h e 48h. No entanto, a maioria das cepas de *Salmonella* sp não crescem nesse meio.

#### **4.5 Determinação de helmintos, protozoários e artrópodes em alfaces**

Diante da inexistência de um procedimento padronizado para realizar análise parasitológica de alimentos, precisamente de vegetais, desenvolveu-se uma metodologia a partir do método de Lutz (1919) ou Hoffman, Pons e Janer (1934) (sedimentação espontânea em água) realizando adaptações e/ou adequações.

Para padronizar a metodologia empregada, o primeiro passo foi a determinação da amostragem, a qual foi equivalente a uma touceira ou pé de alface.

##### **4.5.1 Descrição do procedimento analítico**

Após pesagem equivalente a uma touceira de alface conforme descrito no item 4.2 (Figura 2) o procedimento de higienização pelo método teste e tradicional (Figura 3) foi efetuado da seguinte forma:

I. Em cada etapa da higienização as folhas foram lavadas uma a uma por imersão em um litro de água e esfregadas manualmente para remoção de detritos. As mãos foram protegidas com luvas de látex em todo o processo.

II. O líquido obtido em cada etapa do processo foi filtrado através de peneira com gaze dobrada 3X e recolhido em três cálices de sedimentação aos quais se adicionou formol comercial até a concentração de 10%.

III. Foram deixadas sedimentar por 24h.

IV. A seguir, com auxílio de pipeta, retirou-se 5mL do sedimento de cada cálice, que foram transferidos para tubos cônicos e centrifugados a 3000rpm/3min, em centrífuga IEC CENTRA-7R Refrigerated Centrifuge.

V. As lâminas foram preparadas com 0,1mL do sedimento centrifugado, “coradas” com lugol e examinadas ao microscópio ótico (MO) utilizando aumentos de 100X e 400X. As leituras foram realizadas em triplicata, a intervalos de no mínimo duas horas, por mais de três analistas.

#### 4.6 Análise estatística

Para as análises estatísticas foram aplicados os seguintes métodos: Teste de Levone para igualdade de variâncias; Teste *Kolmogorov-Smirnov* para análise de normalidade; Teste de *Student* e de *Mann-Whitney* para a comparação de duas médias; Teste *Kruskal-Wallis* para comparação de três grupos; Teste *Dawss-Steel-Chritchlow-Flingner* a fim de conhecer quais pares diferem. Fez-se análise de variância de blocos para análise das médias das contagens após cada etapa dos processos de higienização, controlando-se os dados dos tipos de métodos empregados.

Para as análises parasitárias aplicou-se ainda, Testes t Student para a comparação de duas médias; Teste de F de Snedecor e Teste de Tukey para as comparações de três ou mais variáveis.

Consideraram-se como estatisticamente significantes as análises inferenciais com  $p < 0,05$ .

Os dados foram processados na SSPS versão 14.0 (SPSS Inc. Chicago, Estados Unidos).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação de coliformes fecais nas alfaces *in natura* de diferentes cultivos e o efeito dos processos de higienização

Os resultados da determinação de coliformes fecais (NMP/g) em cada amostra *in natura* das alfaces provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico; e após as etapas de higienização efetuadas no método teste e método tradicional são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

A presença de coliformes fecais (NMP/g) nas alfaces de cultivo convencional variou de <3,0 a 930NMP/g, onde 50% das amostras (1, 2, 4, 5 e 10 – Tabela 4) apresentaram contagens acima do recomendado pela legislação (BRASIL, 2001), que define valor máximo de 100NMP/g para hortaliças. Nas alfaces orgânicas, a variação foi de <3,0 a 430NMP/g (Tabela 5); e nas alfaces hidropônicas as contagens oscilaram entre 3,6 a 150NMP/g (Tabela 6). Destes dois últimos tipos, 90% apresentaram-se dentro do padrão microbiológico proposto pela RDC Nº12/2001, exceto uma amostra orgânica (430NMP/g) e uma hidropônica (150NMP/g). Duas amostras (7 e 8) de alfaces convencionais (Tabela 4) e três orgânicas (3, 4, e 5) apresentaram baixas contagens de coliformes fecais.

Martins e colaboradores (2008) observaram resultados próximos aos encontrados nesta pesquisa em análise de 35 amostras de alfaces convencionais verificando que todas estavam com carga microbiana (coliformes fecais e *E. coli*) acima do permitido pela legislação. Santana *et al.* (2006) obtiveram resultados diferentes ao encontrado no presente estudo para alfaces orgânicas, pois verificaram que 100% das amostras analisadas (n=60), apresentaram contaminação por coliformes fecais e *E. coli*, estando portanto, fora do padrão mínimo estabelecido pela legislação. Por outro lado, os dados obtidos por Abreu e colaboradores (2010) estão de acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa, uma vez que estes não encontraram contaminação de origem fecal em 15 repetições de alfaces orgânicas adubadas experimentalmente. Coelho, Rosa e Lima (2007) também avaliaram a contagem de coliformes fecais em quinze amostras de alfaces hidropônicas e constataram que todas apresentavam carga microbiana acima do

Tabela 4 – População de coliformes fecais em amostras de **alfaces provenientes de cultivo convencional** higienizadas pelos métodos teste e tradicional

Nº de amostras	Controle		Método teste		Método tradicional
	<i>In natura</i> NMP/g	Pré-lavado NMP/g	Lav. com detergente NMP/g	Sanitizado NMP/g	Sanitizado NMP/g
1	750	430	75	3,6	15
2	930	3,6	3,6	<3,0	<3,0
3	15	< 3,0	3,6	< 3,0	3,6
4	230	93	43	9,2	43
5	430	43	23	3,6	9,2
6	75	9,2	9,2	3,0	3,6
7	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0
8	< 3,0	<3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0
9	93	7,4	3,6	3,6	<3,0
10	930	930	130	93	210
Varição	<3,0 a 930	<3,0 a 930	<3,0 a 130	<3,0 a 93	<3,0 a 210

Tabela 5 – População de coliformes fecais em amostras de **alfaces provenientes de cultivo orgânico** higienizadas pelos métodos teste e tradicional

Nº de amostras	Controle		Método teste		Método tradicional
	<i>In natura</i> NMP/g	Pré-lavado NMP/g	Lav. com detergente NMP/g	Sanitizado NMP/g	Sanitizado NMP/g
1	3,6	3,6	<3,0	<3,0	<3,0
2	430	93	3,6	<3,0	<3,0
3	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
4	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
5	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
6	9,2	9,2	3,6	<3,0	<3,0
7	93	15	3,6	<3,0	3,6
8	11	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
9	3,6	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
10	9,2	3,6	3,0	<3,0	<3,0
Variação	<3,0 a 430	<3,0 a 93	<3,0 a 3,6	< 3,0	< 3,0

Tabela 6 – População de coliformes fecais em amostras de **alfaces provenientes de cultivo hidropônico** higienizadas pelos métodos teste e tradicional

Nº de amostras	Controle (alface <i>in natura</i> ) NMP/g	Pré-lavado NMP/g	Sanitização teste		Sanitização tradicional
			Lav. com detergente NMP/g	Sanitizado NMP/g	Sanitizado NMP/g
1	93	23	9,2	9,2	15
2	3,6	3,0	3,0	3,0	3,0
3	21	9,2	<3,0	<3,0	<3,0
4	75	28	9,2	<3,0	<3,0
5	35	23	20	3,6	3,0
6	28	15	14	<3,0	9,2
7	150	20	20	15	120
8	23	3,6	<3,0	<3,0	<3,0
9	15	3,6	<3,0	<3,0	3,6
10	43	23	23	15	<3,0
Varição	3,6 a 150	3 a 28	<3,0 a 23	<3,0 a 15	<3,0 a 120

recomendado ( $10^2$ ), supondo que a contaminação pode ter sido devido à água ou à solução nutritiva utilizada. Sabe-se, portanto, que altas contagens desses microrganismos indicam a qualidade do solo e da água utilizada no manuseio da hortaliça.

Os resultados das contagens de coliformes fecais foram obtidos a partir da tabela do Número Mais Provável (NMP) (APHA, 2001), que fornece resultados sensíveis, com valores variando no intervalo de  $<3,0$  a  $>1100$ NMP/g, permitindo fazer a avaliação da redução do número de coliformes fecais entre as etapas de ambos os métodos empregados: teste e tradicional.

Na etapa da pré-lavagem – comum aos dois métodos – a redução da carga microbiana de coliformes fecais ocorreu em 70% das alfaces convencionais (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9); em 50% das orgânicas (2, 7, 8, 9 e 10) e em 100% das hidropônicas (Tabelas 5, 6 e 7). Foi obtida redução de 90% da população inicial do controle (alface “in natura”) em 50% das amostras de cultivo convencional (3, 7, 8 e 9), em 20% das orgânicas (2 e 8) e em 40% das hidropônicas (3, 7, 8 e 9) na etapa da pré-lavagem. Os dados da contagem de coliformes fecais no controle mostram que houve uma redução de 90% da população inicial através do processo de pré-lavagem. Nascimento *et al.* (2003a) e Wisniewsky, Gleason, Reitmeier (2000) também constataram redução da carga microbiana de coliformes fecais e *E. coli* na lavagem das alfaces apenas com água corrente, (n=100 e n=120, respectivamente), estando de acordo com Beuchat *et al.* (2001), quando afirma que a pré-lavagem pode reduzir até 90% da carga microbiana inicial.

Após a lavagem com detergente (Tabelas 4, 5 e 6), verificou-se que a redução da contaminação fecal ocorreu em 50% das amostras de alfaces convencionais (1, 4, 5, 9 e 10), em 50% das orgânicas (1, 2, 6, 7 e 10) e em 80% das hidropônicas (exceto amostras 2 e 10). Nos três tipos de cultivo estudados, a lavagem com detergente reduziu em 90% a população presente na alface pré-lavada em duas amostras.

Ao final da higienização pelo Método Teste, 80% das alfaces convencionais (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10) apresentaram diminuição na contagem de coliformes fecais (NMP/g) em relação ao controle (Tabela 4). Nas amostras orgânicas essa diminuição foi observada em 70% das amostras (1, 2, 6, 7, 8, 9 e 10) e em 100% das hidropônicas (Tabelas 5 e 6). As alfaces convencionais sanitizadas pelo método teste reduziram a população de coliformes fecais do controle em um e

dois ciclos logarítmicos para 4 amostras (3, 6, 9 e 10) e (1, 2, 4 e 5), respectivamente (Tabela 4). Nas alfaces orgânicas duas amostras apresentaram redução de um ciclo logarítmico (7 e 8) e outra de dois ciclos (amostra 7) (Tabela 5). Nas alfaces hidropônicas (Tabela 6) em oito amostras (exceto 2 e 10) ocorreu redução de 90% da população de coliformes fecais em relação ao controle.

Considerando todas as 30 amostras analisadas (alfaces convencionais, orgânicas e hidropônicas), em 63% ocorreu redução de 90% da população de coliformes fecais após o processo de sanitização pelo método teste. Contudo, a eficiência real do processo de sanitização por este método foi de 95% (um ciclo logarítmico), uma vez que duas amostras convencionais, sete orgânicas e uma hidropônica apresentaram contagem inicial (controle) entre <3,0 e 9,2 NMP de coliformes fecais/g.

Nascimento e colaboradores (2003b) estudaram a eficácia de diferentes sanitizantes na higienização de uvas (10 amostras) e verificaram que o cloro a 200ppm reduziu a contagem inicial de coliformes fecais em todas as amostras (máximo de 2 ciclos). Bruno e Pinto (2004) avaliaram apenas o efeito do hipoclorito de sódio – concentração de 4mg/L por 15 minutos – e, constataram redução de dois ciclos logarítmicos de coliformes fecais nas amostras de salsa e apenas um ciclo nas amostras de coentro. Por outro lado, Mariano, Teixeira e Okura (2005) verificaram efeito contrário ao constatarem a eficácia do hipoclorito de sódio (200ppm) em alfaces hidropônicas, o qual reduziu a contagem de coliformes termotolerantes em 71,6% das amostras, em no máximo um ciclo logarítmico. Porém, o efeito de detergentes comerciais não foi estudado por estes autores.

As amostras dos três tipos de alfaces, depois que submetidas ao processo de sanitização pelo método tradicional (Tabelas 4, 5 e 6), tiveram redução na contagem em: 80% das amostras convencionais (exceto 7 e 8); 70% das orgânicas (exceto 3, 4 e 5); e em 100% nas hidropônicas. A população de coliformes fecais na etapa controle (alfaces “in natura”) apresentaram a seguinte redução após o processo de sanitização pelo método tradicional: nas alfaces de cultivo convencional cinco amostras (1, 3, 4, 5 e 9) reduziram um ciclo logarítmico e duas (2 e 5) dois ciclos logarítmicos; nas de cultivo orgânico duas (7 e 8) reduziram um ciclo logarítmico e uma amostra (2) em dois ciclos. Para as alfaces de cultivo hidropônico ocorreu redução de um ciclo logarítmico em sete amostra (exceto 1, 2 e 7).



Para as 30 amostras de alfaces “in natura”, ocorreu redução em 90% da população inicial de coliformes fecais em 56,7% nas alfaces dos três tipos de cultivos analisados. Considerando as dez amostras com contagem inicial de coliformes fecais de < 3,0 a 9,2NMP/g verificou-se uma redução de 90% da população de coliformes fecais da alface controle em 85% das amostras após a sanitização tradicional.

Fazendo uma comparação entre a etapa de Lavagem com Detergente – no método teste – com a sanitização do método tradicional, observou-se que a redução da contagem de coliformes foi semelhante ou com valores muito próximos em todas as amostras orgânicas, em 40% das convencionais (2, 3, 4 e 9) e em 40% das hidropônicas (2, 3, 8 e 9).

Comparando os resultados ao final da higienização no método tradicional com o método teste, observou-se que a variação dos resultados foi de: <3,0 a 93NMP/g e <3,0 a 210NMP/g nas convencionais; nas orgânicas foi de <3,0NMP/g em ambos os métodos; e de <3,0 a 15NMP/g e <3,0 a 120NMP/g nas hidropônicas. (Tabelas 4, 5 e 6).

A eficiência real do processo de sanitização, com redução de 90% da população inicial de coliformes fecais (NMP/g) foi de 95% pelo método teste e 85% pelo método tradicional. No entanto, os resultados das análises estatísticas da comparação dos métodos (variância em blocos – two-way) apresentados na Tabela 7 indicam que não houve diferenças significativas entre si ( $p=0,408$ ).

Tabela 7 – Comparação dos métodos de higienização empregados independente dos tipos de alface

	MÉDIA <sup>1</sup> ± DP	IC 95%
<b>Método teste</b>	58±17 <sup>a</sup>	3 – 930
<b>Método tradicional</b>	77± 196 <sup>a</sup>	3 – 930

<sup>1</sup> Média obtida pela análise de variância em blocos (two-way); (NMP/g).

\*Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade ( $p=0,408$ ).

Embora ambos os métodos não mostrarem diferença significativa entre si, é possível comparar as médias das contagens de coliformes fecais (NMP/g) dos diferentes tipos de alfaces e entre as etapas do método teste e do tradicional. Isto foi

possível porque os diferentes tipos de alfaces apresentaram efeito significativo sobre os resultados. Dentre eles, verificou-se que a convencional apresentou maior contaminação inicial (*in natura*) por coliformes fecais (346NMP/g), estando, portanto, com contagens médias acima do recomendado pela legislação ( $10^2$ ). Nas alfaces orgânicas e hidropônicas, a média de contaminação foram baixas: 57NMP/g e 47NMP/g. A contaminação das alfaces convencionais pode estar relacionada com a qualidade do adubo, que possivelmente estaria contaminado por dejetos fecais humano e ou de animais, bem como pela baixa qualidade da água de irrigação.

Por outro lado, Tavares e Saraiva (2006) obtiveram resultados contrários, pois detectaram média de contaminação por coliformes fecais bem maior nas alfaces hidropônicas (>2400 NMP/g) do que nas de cultivo convencional e orgânico (ambas com 9NMP/g), num total de 9 amostras para cada.

As médias de contaminação fecal nas alfaces convencionais, orgânicas e hidropônicas, após serem pré-lavadas, não mostraram diferença significativa (Tabela 8). Estudo comparativo de diferentes protocolos de higienização realizado por Oliveira (2008) mostra que a lavagem apenas com água, reduziu em dois ciclos logarítmicos a contaminação média de coliformes fecais, de  $1,21 \times 10^5$  UFC/g para  $9,40 \times 10^3$  UFC/g em oito pés de alfaces coletados no comércio de Porto Alegre-RS.

A contagem média de coliformes fecais nas amostras convencionais e nas orgânicas após a lavagem com detergente (Tabela 8), tiveram redução média de um ciclo logarítmico. Na etapa de sanitização, todos os tipos de alfaces apresentaram redução significativa quando comparadas com a etapa controle (alface "*in natura*") para o método teste.

A sanitização pelo método tradicional, tanto nas amostras convencionais como nas orgânicas, na etapa controle, também reduziu a contagem média inicial de coliformes fecais em um ciclo logarítmico. Analisando este processo para as amostras hidropônicas, observou-se que não apresentaram esse mesmo resultado ( $p=1,000$ ). Nascimento *et al.* (2003c) constataram a eficiência da sanitização com hipoclorito de sódio (200ppm/15min.) na redução da contagem média de coliformes fecais em dois ciclos logarítmicos, em dez amostras de alfaces estudadas.

Ao comparar o método teste com o tradicional na redução da população de coliformes fecais (NMP/g) das alfaces "*in natura*" (etapa controle) e após o processo de sanitização verificou-se que o método teste foi estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) para as amostras de cultivo convencional, orgânico e hidropônico,

Tabela 8 – Valores médios da contagem de coliformes fecais nas amostras de alface de cultivo convencional, orgânico e hidropônico higienizadas pelos métodos teste e tradicional.

MÉTODO	PROCEDIMENTO	MÉDIA <sup>1*</sup> ± DP					
		CONVENCIONAL	MÍN./MÁX.	ORGÂNICO	MÍN./MÁX.	HIDROPÔNICO	MÍN./MÁX.
	<i>In natura</i>	346 ± 387 <sup>a</sup>	<3 a 930	57 ± 134 <sup>a</sup>	<3 a 430	47 ± 45 <sup>a</sup>	4 a 150
	Pré-lav. c/água	152 ± 303 <sup>a</sup>	<3 a 930	14 ± 28 <sup>a</sup>	<3 a 93	15 ± 10 <sup>a</sup>	3 a 28
<b>TESTE</b>	Lav. c/ detergente	30 ± 42 <sup>b</sup>	<3 a 130	3 ± 221 <sup>b</sup>	<3 a 4	11 ± 8 <sup>a</sup>	<3 a 23
	Sanitizado	13 ± 28 <sup>b</sup>	<3 a 93	3 ± 221 <sup>b</sup>	<3 a 4	6 ± 5 <sup>b</sup>	<3 a 15
<b>TRADICIONAL</b>	Sanitizado	30 ± 65 <sup>b</sup>	<3 a 210	3 ± 221 <sup>b</sup>	<3 a 4	29 ± 44 <sup>a</sup>	<3 a 120

<sup>1</sup> Resultados em NMP/g

\* Contagem microbiana média de 30 repetições avaliadas separadamente (NMP/g)

\*\*Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo Teste Kruskal-Wallis, teste não-paramétrico indicado para amostras que não apresentam uma distribuição normal; e pelo Teste Mann-Whitney para comparação de cada etapa dentro dos dois métodos.

enquanto para o método tradicional, dos três tipos de cultivos, o hidropônico não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Comparando o efeito da sanitização pelo método tradicional com a etapa de lavagem com detergente (realizado no método teste), constatou-se que não houve diferença significativa nas amostras de todos os tipos de alfaces analisadas. Deste modo, pelas médias estatísticas apresentadas, com um intervalo de confiança a 95%, pode-se afirmar que a etapa de lavagem com detergente foi eficaz para a redução microbiológica de coliformes fecais, podendo ser utilizado em substituição a sanitização pelo Método Tradicional – uso apenas de solução clorada a 200ppm/ 15 minutos.

## **5.2 Pesquisa de *Salmonella* sp. nas alfaces convencionais, orgânicas e hidropônicas**

Em todas as amostras provenientes de cultivo convencional não foi constatada a presença de *Salmonella* sp. em 25g do produto. Esse resultado indica que as alfaces estavam em conformidade com o padrão estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001).

Os estudos obtidos por Cunha (2007) e Paula *et al.* (2003) também não detectaram *Salmonella* sp. em amostras de alfaces prontas, servidas em restaurantes *self-service* da cidade de Niterói – RJ nem em alfaces minimamente processadas comercializadas em Fortaleza-CE, respectivamente.

Por outro lado, Tanako, Devico e Felipe (2009) constataram contaminação por *Salmonella* sp. em 14,28% das amostras de alfaces comercializadas em feiras livres da cidade de Maringá (PR), as quais foram consideradas impróprias ao consumo e indicativas das condições sanitárias, tanto das áreas de cultivo quanto da qualidade da água utilizada na irrigação, das condições de higiene das embalagens utilizadas no acondicionamento dos vegetais ou do próprio ambiente de comercialização.

Nas alfaces orgânicas não foi constatada *Salmonella* sp. estando todas em conformidade com a RDC nº 12/2001 da ANVISA (Grupo 2.a do Anexo 1) que assegura que este microrganismo deve estar ausente nos vegetais consumidos crus.

Santana *et al.* (2006) avaliaram alface orgânica (n=60) coletadas em supermercados de Salvador-BA e, também constataram ausência desse patógeno. Recentemente, Arbos (2009) e Abreu *et al.* (2010) também não detectaram a presença de *Salmonella* sp. nas alfaces provenientes de cultivo com adubação orgânica plantadas em áreas experimentais.

Nas alfaces hidropônicas foi evidenciada a presença de *Salmonella* sp. nas amostras 4 (amostra de alface controle) e 8 (amostra de alface após a lavagem com detergente), que apresentaram, contagens de coliformes fecais de 75 e 23NMP/g, respectivamente. A detecção deste microrganismo em etapas diferenciadas justifica-se pela distribuição da microbiota presente na hortaliça e quanto a homogeneização adequada no momento do preparo da amostra. Portanto, tais amostras apresentaram-se fora do padrão microbiológico estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001).

A presença deste microrganismo indica falhas na manipulação agrícola da hortaliça que podem ter sido ocasionadas durante o preparo das soluções nutritivas, ou devido às condições de higiene do manipulador, ou da água de abastecimento, ou da área de cultivo ou até mesmo devido às condições de transporte e entrega (caixas contaminadas, veículo em más condições de higiene, bem como o local de recebimento, dentre outros).

Santana *et al.* (2006) não detectaram *Salmonella* sp. em alfaces hidropônicas coletadas na região Oeste do Paraná. Resultados semelhantes foram obtidos por Tanaka, Felipe e Devico (2009) em alfaces hidropônicas comercializadas em Maringá-PR, onde 2 amostras das 7 analisadas estavam contaminadas por *Salmonella* sp.

*Salmonella* é considerada patogênica por causar infecções alimentares tendo ação invasiva ao intestino humano ao aderir à mucosa do mesmo.

### 5.3 Detecção de helmintos, protozoários e artrópodes nos alfaces *in natura*, provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico e após os métodos de higienização empregados

Em todas as amostras dos três tipos de alfaces avaliados, foram detectados protozoários, helmintos e artrópodes. Na Figura 4 são apresentadas as quantidades totais dessas formas encontradas em todas as amostras de cada tipo de cultivo examinadas, que denominaremos aqui de “contaminantes”. Nas amostras hidropônicas a contaminação total foi de 3649 formas sendo 10 vezes maior que nas demais alfaces, graças à presença maciça de artrópodes (3436 formas). As alfaces convencionais apresentaram um total de 334 formas, sendo 64 artrópodes, e as orgânicas com 235 formas, onde 147 eram artrópodes. Com relação aos helmintos, os números de formas presentes em alfaces convencionais (222) e hidropônicas (211) foram próximos, porém foi expressivamente menor nas alfaces orgânicas (70). Quanto aos protozoários, as quantidades decresceram da convencional (48), para a orgânica (18) e a hidropônica (2).

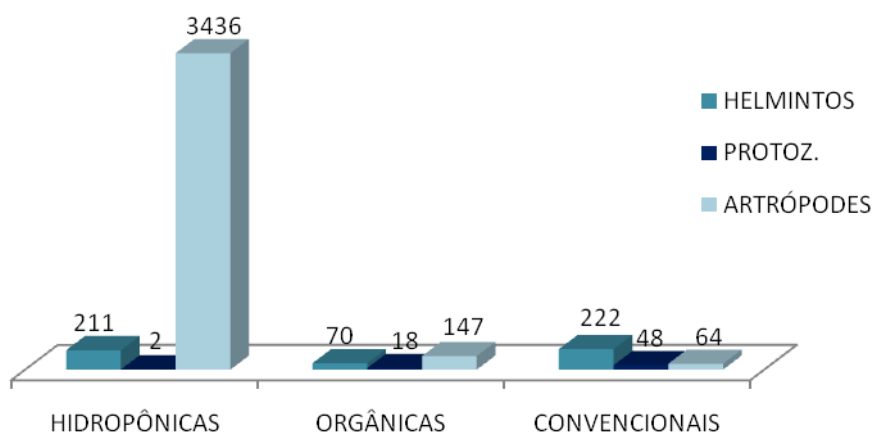


Figura 4 – Presença de helmintos, protozoários e artrópodes nas alfaces de diferentes cultivos.

Pode ser constatado que a destacada presença de artrópodes nas alfaces de cultivo hidropônico se deve ao meio aquático do cultivo, onde proliferam diversos tipos desses invertebrados, entre os micro-crustáceos, ácaros e insetos que habitam naturalmente estes ambientes. Outro fator relevante foi, provavelmente, o não uso de agrotóxicos neste tipo de cultivo, fato que também deve ter influenciado a maior

presença de artrópodes nas alfaces orgânicas que nas convencionais. Segundo Liang et al (2005), Tomazini, Ferraz e Monteiro (2008) no cultivo convencional o uso de defensivos agrícolas com ação inseticida é indiscriminado, interferindo diretamente na microbiota do solo.

Para avaliar a eficácia dos diferentes métodos de higienização empregados, foram contadas as formas totais (protozoários, helmintos e artrópodes) removidas a cada etapa dos procedimentos, tanto no Método Teste, como no Tradicional (Figura 5). Para isto, as águas utilizadas em cada etapa foram recolhidas e submetidas ao método de sedimentação (descrito na metodologia), cujo sedimento foi analisado ao microscópio. Foi realizada uma adaptação do método de Lutz (ou de Hoffmann, Pons e Janer) classicamente usado para pesquisa qualitativa de parasitos em fezes, onde o total da água (1L) de cada etapa foi submetido à sedimentação espontânea (após formolização) em cálices cônicos apropriados, de onde foram retirados 15mL do sedimento, que por sua vez foi centrifugado; finalmente, 0,1mL do sedimento da centrifugação foram examinados com auxílio de microscópio óptico e foram contadas todas as formas de protozoários, helmintos e artrópodes encontradas.

O método desenvolvido foi semi-quantitativo, tornando as diversas etapas e procedimentos comparáveis entre si quanto ao número de formas encontradas. Diversos pesquisadores (GUIMARÃES *et al.*, 2003; LEITE, 2000; MONTANHER *et al.*, 2007; SOARES; CANTOS, 2005; PARTELLI; GONÇALVES, 2005) relatam adaptações do método de Lutz para a análise parasitológica de vegetais, porém nem sempre com a preocupação em padronizar o peso dos alfaces ou volumes de líquido empregados na técnica, bem como a enumeração das formas presentes.

A água da pré-lavagem das alfaces (Figura 3) foi empregada como a etapa inicial e de referência para a realização das comparações. Na Figura 5 encontra-se, de forma panorâmica, a evolução da remoção de formas (total de ovos, larvas e adultos de helmintos; cistos e trofozoítas de protozoários; ovos, larvas e adultos de artrópodes) a cada etapa dos dois processos de higienização comparados. Assim, observou-se que a etapa de lavagem com detergente, no método Teste, foi eficaz na remoção das diversas formas nos três tipos de alface, de forma equiparável ao método convencional, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre os procedimentos Teste e Tradicional (Tabela 9).

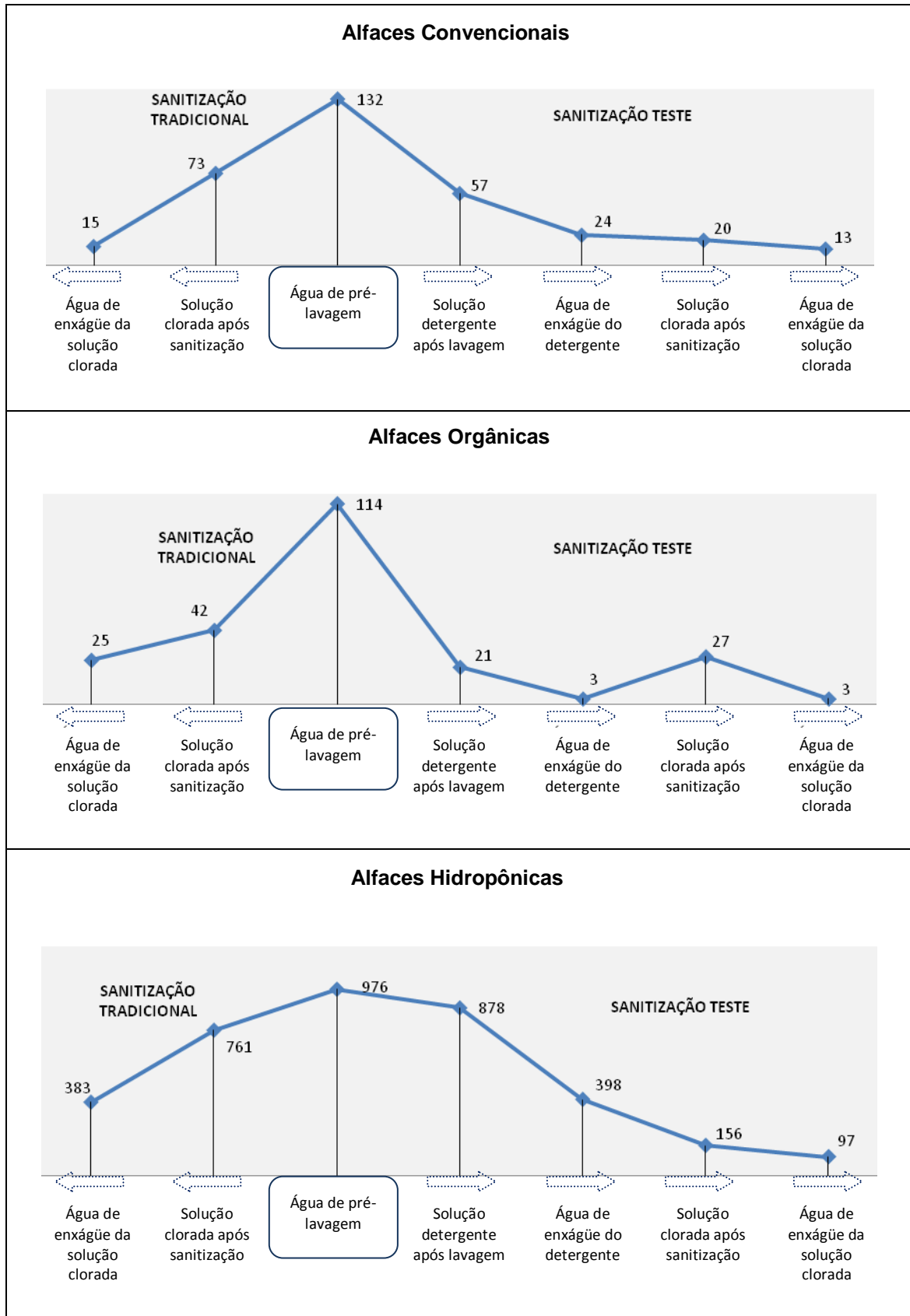


Figura 5 – Comparação da remoção total de protozoários, helmintos e artrópodes das alfaces de diferentes cultivos após as etapas dos métodos de higienização. Os valores apresentados ao longo da curva referem-se ao total de protozoários, helmintos e artrópodes removidos em cada etapa das higienizações. Cada valor total representa a soma das formas contadas nas 10 coletas examinadas nos procedimentos.



Também não houve diferença significativa entre os tipos de alface para a remoção de helmintos e protozoários, porém esta diferença foi significativa para a remoção de artrópodes, nos dois procedimentos (Tabela 9).

Tabela 9 – Remoção do total de helmintos, protozoários e artrópodes nos três tipos de alfaces após o método teste e o método tradicional

Tipo de alface	MÉTODO TESTE			MÉTODO TRADICIONAL		
	Helminto total	Protozoário	Artrópode total	Helminto total	Protozoário	Artrópode total
<b>Convencional</b>	3,12 ± 5,63 <sup>a</sup>	0,80 ± 2,96 <sup>b</sup>	1,0 ± 1,70 <sup>c</sup>	3,30 ± 5,44 <sup>a</sup>	0,40 ± 1,35 <sup>b</sup>	0,70 ± 1,26 <sup>c</sup>
<b>Orgânico</b>	0,66 ± 1,30 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,65 <sup>b</sup>	2,0 ± 3,60 <sup>d</sup>	0,85 ± 1,30 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,30 <sup>b</sup>	2,35 ± 3,44 <sup>d</sup>
<b>Hidropônico</b>	2,68 ± 3,60 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,19 <sup>b</sup>	47,48 ± 81,99 <sup>e</sup>	3,85 ± 5,34 <sup>a</sup>	0 ± 0,16 <sup>b</sup>	53,35 ± 78,15 <sup>e</sup>

Os valores expressam a média ± desvio padrão. Na análise de cada coluna, (MÉDIA ± DP) seguidas da mesma letra, representam situações que não apresentaram, entre si, diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pela análise em bloco (two-way).

Soares e Cantos (2006) avaliaram a descontaminação “parasitária” de alfaces por 3 diferentes produtos químicos em solução: um sanitizante comercial à base de hipoclorito de sódio (0,025 mg/mL) e permanganato de potássio (0,002 mg/mL), um detergente (0,3 mg/mL de lauril éter sulfato de sódio e 0,25 mg/mL de álcool láurico etoxilado) e o ácido acético; os autores detectaram que a solução do sanitizante comercial retirou mais estruturas parasitárias que a solução de detergente, resultado compatível com os do presente trabalho.

Massara e colaboradores (2003) avaliaram o efeito ovicida *in vitro* de dezesseis produtos para uso na higienização de ambientes, incluindo desinfetantes e detergentes, sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*. Embora não se refira à sanitização de alimentos com remoção dos seus contaminantes, os autores mostraram que dois tipos de detergente (linear alquil benzeno sulfonato de sódio e um tensoativo a 2,0-2,5%) tiveram capacidade superior aos produtos contendo hipoclorito na redução do embrionamento dos ovos do helminto. Assim, podemos supor que, além de remover contaminantes, o uso de detergente na sanitização de vegetais poderia ter a vantagem adicional de promover a inativação de formas não removidas.

As Figuras 6 (referente à alface convencional), 7 (referente à alface orgânica) e 8 (referente à alface hidropônica) apresentam para cada tipo de cultivo e etapa dos dois processos de higienização, os resultados das remoções de helmintos, artrópodes e protozoários. Este procedimento foi executado, pois segundo Amato Neto (2008) e Gasparini (2004) os ovos, notadamente os de helmintos, podem ter componentes adesivos na superfície externa, que dificultam sua remoção.

Cistos e trofozoítas de protozoários foram as formas menos encontradas nos 3 tipos de alfaces e que foram gradualmente removidos (até  $\leq 1$ ) ao longo das etapas dos processos de higienização (Figuras 6, 7 e 8).

Quanto aos helmintos (larvas/adultos), pode-se observar nas alfaces convencionais e orgânicas (Figuras 6 e 7) que na pré-lavagem inicial foram proporcionalmente removidas mais larvas/adultos que nas demais etapas; já os ovos foram removidos em proporções crescentes nas etapas subsequentes à pré-lavagem, nos dois procedimentos de sanitização. Na alface hidropônica (Figura 8), isto foi observado nos dois processos de sanitização. Embora sem validação estatística, esta observação justifica o cuidado em separar ovos de larvas/adultos, pois podemos especular que estes são removidos mais facilmente que ovos. Por sua vez, a remoção destes, seria incrementada pela ação do agente sanitizante.

A Figura 9 mostra em termos percentuais esta proporção de helmintos larva/adulto:ovo removidos das alfaces convencional e orgânica, confirmando mais claramente a observação acima.

Foram observadas as seguintes quantidades totais de artrópodes (Figuras 6, 7 e 8), em cada tipo de alface: convencional - 29 ovos e 35 l/a (valores próximos nas 2 colunas); orgânica - 130 ovos e 18 l/a (7,2 vezes mais ovos que l/a); e hidropônica - 3199 ovos e 237 l/a (14,5 vezes mais ovos que l/a); a remoção de ovos ou l/a foi aleatória nas diferentes etapas das sanitizações.

É provável que estas discrepâncias numéricas reflitam o estresse a que estes artrópodes de vida livre estão submetidos em cada ambiente de cultivo das alfaces. No cultivo convencional, o uso intensivo de agrotóxicos resultaria em baixa atividade reprodutiva, com menor produção de ovos. Já o cultivo orgânico, isento de agrotóxicos, não impediria a multiplicação dos artrópodes no solo úmido, resultando em maior quantidade de ovos; ácaros e insetos foram os tipos mais observados nesses cultivos. O ambiente aquático de cultivo das alfaces hidropônicas foi o que

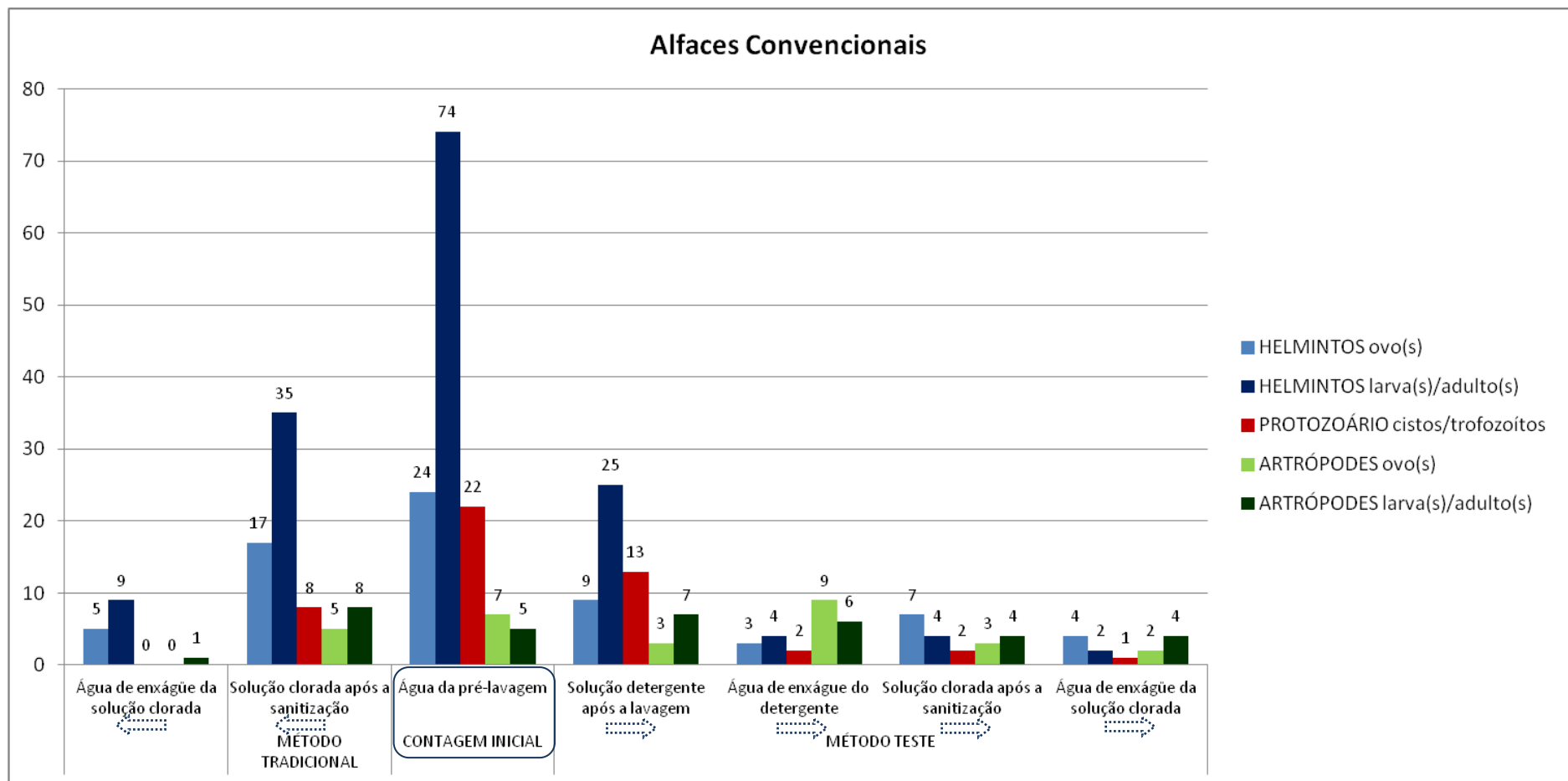


Figura 6 – Remoção de protozoários, helmintos e artrópodes das **alfaces convencionais** após as etapas da higienização pelo método teste e tradicional. Cada valor total representa a soma das formas contadas nas 10 amostras examinadas nos procedimentos.

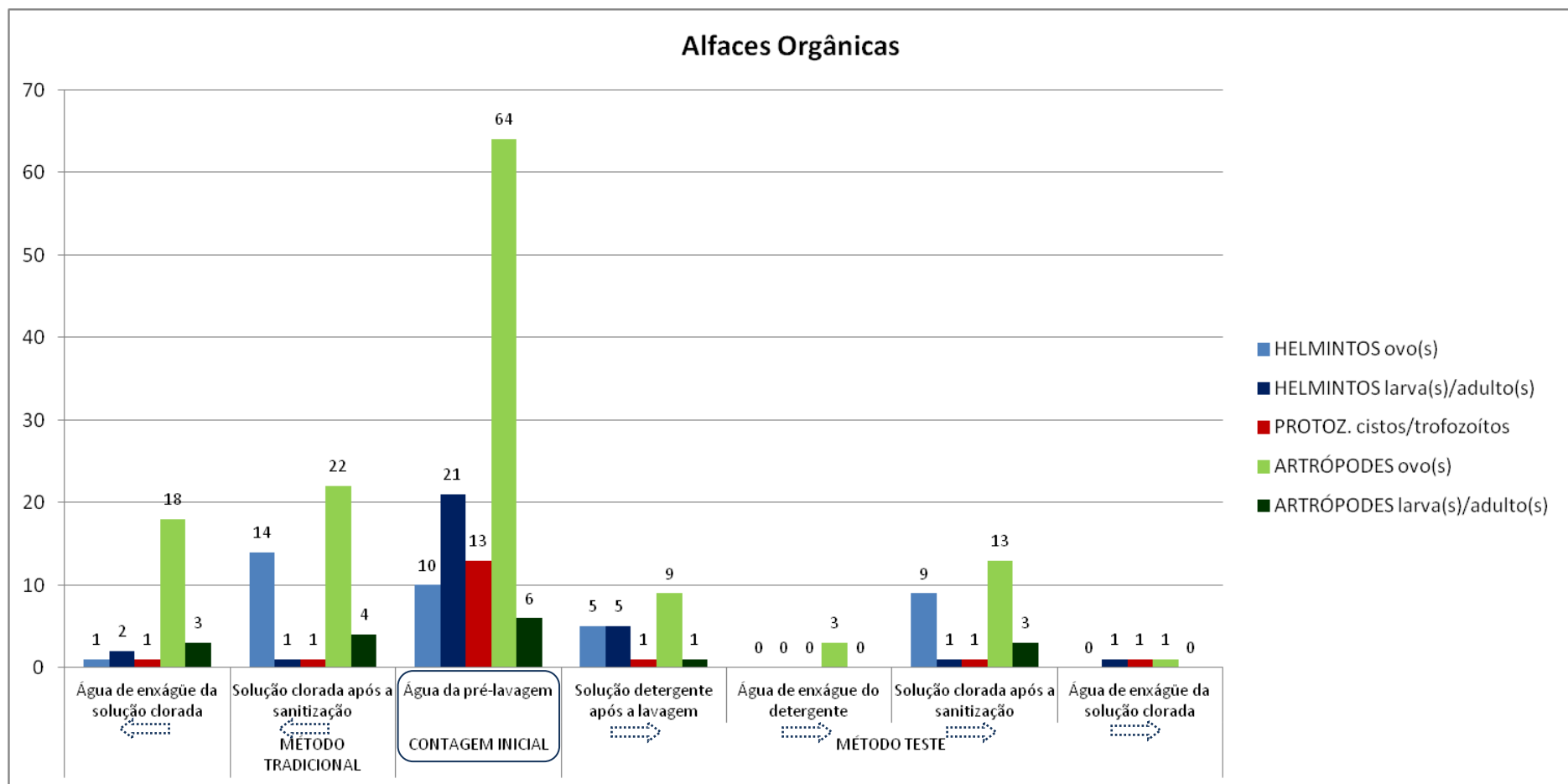


Figura 7 – Remoção de protozoários, helmintos e artrópodes das **alfaces orgânicas** após as etapas da higienização pelo método teste e tradicional. Cada valor total representa a soma das formas contadas nas 10 amostras examinadas nos procedimentos.

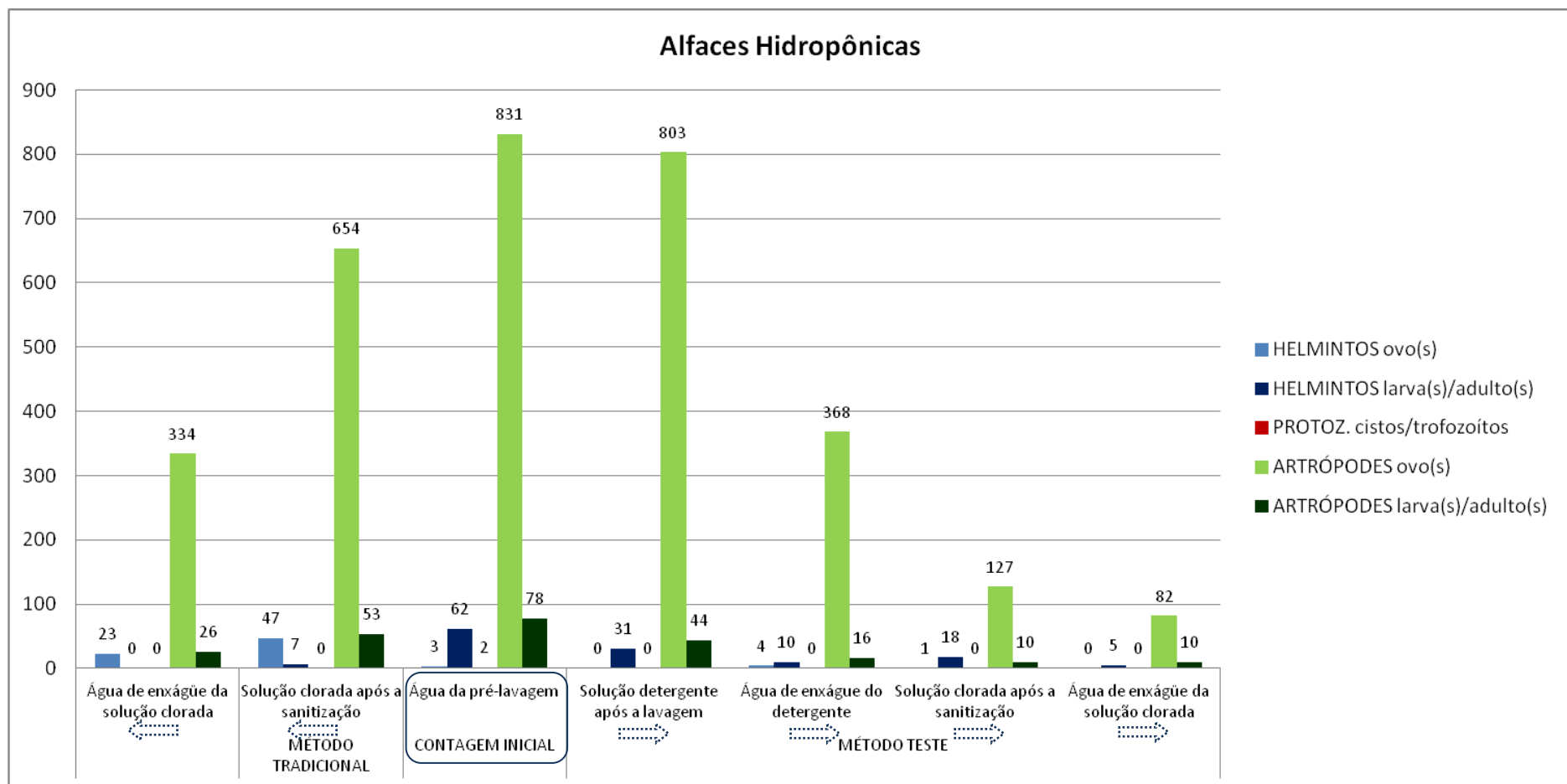


Figura 8 – Remoção de protozoários, helmintos e artrópodes das **alfaces hidropônicas** após as etapas da higienização pelo método teste e tradicional. Cada valor total representa a soma das formas contadas nas 10 amostras examinadas nos procedimentos.

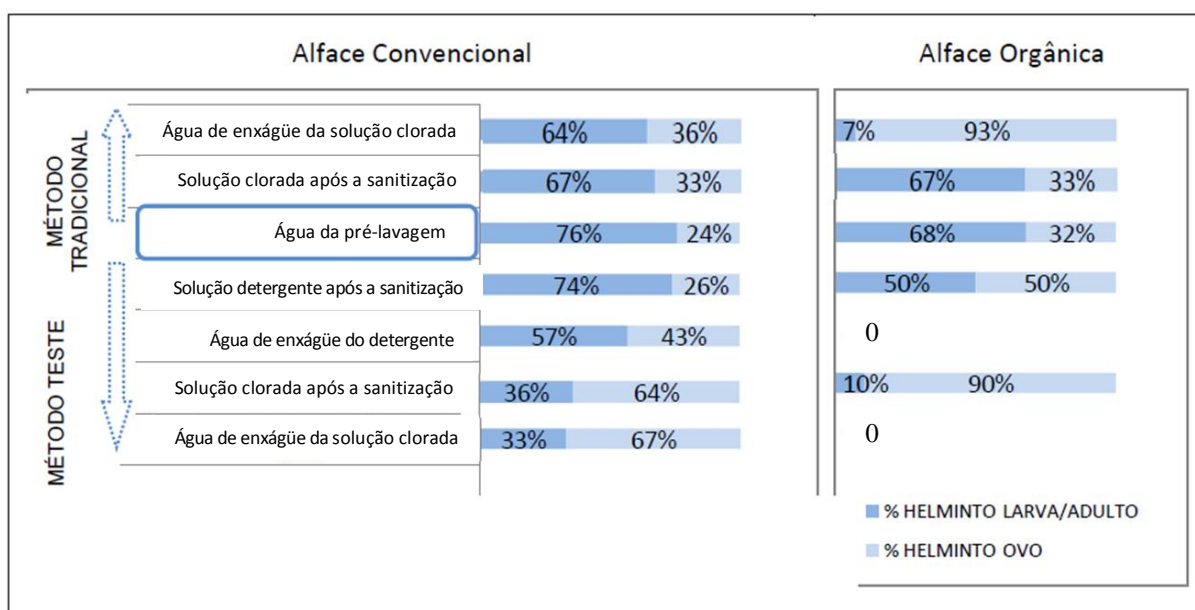


Figura 9 – Remoção (%) de larvas/adultos e ovos de helmintos das alfaces convencionais e orgânicas. Em cada etapa dos métodos de higienização, considerou-se larva/adulto + ovo = 100% de formas removidas.

ofereceu as condições mais confortáveis aos artrópodes, principalmente os copépodes, crustáceos microscópicos encontrados em abundância. A classe Copepoda é a maior e mais diversificada dos crustáceos, sendo encontrada nos oceanos e em qualquer *habitat* de água fresca – até em solos úmidos –, onde se alimentam de bactérias, algas, detritos orgânicos, etc. São considerados o grupo de organismos pluricelulares mais abundante no planeta, superando até mesmo os insetos em número de indivíduos (COPEPODS, 2011). Portanto, o achado de numerosos artrópodes em plena atividade reprodutiva, nas alfaces de cultivo hidropônico, reflete apenas a boa qualidade ecológica do ambiente (GUPTA; NEATE; LEONARD, 2001; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2003).

Quando foi comparada etapa por etapa, a eficiência dos dois métodos de higienização para remover helmintos, protozoários e artrópodes das alfaces (médias obtidas dos três tipos), verificou-se diferença significativa entre as diferentes etapas dos procedimentos apenas para remoção de helmintos, com melhor eficiência do procedimento Teste (Tabela 10). Com base na análise estatística pode-se sugerir que o procedimento Teste realizado apenas com detergente alcançaria os resultados próximos com aqueles obtidos pelo detergente e uso de solução clorada (água de enxágüe após a solução detergente =  $0,70 \pm 1,70$ ; água de enxágüe após solução clorada =  $0,40 \pm 0,72$ ).

Estes dados sugerem que a higienização das alfaces em diferentes etapas, inclusive com uso de sanitizantes, é necessária para a remoção de helmintos. Neste trabalho, a remoção de protozoários e artrópodes parece não ter sido afetada pelo número e composição das etapas. Porém, a remoção mais efetiva de helmintos é suficiente, por si só, para que se recomende a higienização de alfaces em mais de uma etapa e com uso de sanitizantes devido ao risco que podem causar a saúde, ou seja, podem indicar presença de parasitos humanos.

Nesta pesquisa, a “avaliação parasitológica” de alfaces foi realizada prezando a qualidade desses vegetais para o consumo humano, uma vez que podem veicular parasitos do homem ou de animais, mas com potencial patogênico para o homem, que possam infectá-lo quando a alface é ingerida ou manipulada. A Resolução nº12/1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) da ANVISA (BRASIL, 1978), a qual foi revogada pela RDC nº175/2003 (BRASIL, 2003), descreve que as hortaliças a serem consumidas cruas apresentem padrão de qualidade satisfatório atestado por análise microscópica, com “ausência de sujidades, parasitas e larvas”, não existindo atualmente, legislação sobre a qualidade microscópica da referida matéria-prima.

Tabela 10 – Remoção do total de **helmintos, protozoários e artrópodes** após cada etapa dos dois métodos de higienização

Método	Amostras	Helminto	Protozoário	Artrópode
	Água da pré-lavagem	6,03 ± 7,04 <sup>a</sup>	1,23 ± 3,22 <sup>c</sup>	33,03 ± 73,76 <sup>b</sup>
<b>Teste</b>	Solução detergente após a lavagem	2,30 ± 2,46 <sup>b</sup>	0,47 ± 2,01 <sup>c</sup>	28,90 ± 76,96 <sup>b</sup>
	Água de enxágüe do detergente	0,70 ± 1,70 <sup>c</sup>	0,7 ± 0,36 <sup>c</sup>	13,4 ± 39,25 <sup>b</sup>
	Solução clorada após a sanitização	1,33 ± 1,84 <sup>d</sup>	1,33 ± 1,84 <sup>c</sup>	5,33 ± 9,48 <sup>b</sup>
	Água de enxágüe da solução clorada	0,40 ± 0,72 <sup>e</sup>	0,07 ± 0,25 <sup>c</sup>	3,33 ± 7,09 <sup>b</sup>
<b>Tradicional</b>	Solução clorada após a sanitização	4,0 ± 5,69 <sup>a</sup>	0,30 ± 1,19 <sup>c</sup>	24,87 ± 63,02 <sup>b</sup>
	Água de enxágüe da solução clorada	1,33 ± 2,56 <sup>f</sup>	0,03 ± 0,18 <sup>c</sup>	12,73 ± 34,62 <sup>b</sup>

Os valores expressam a média ± desvio padrão. Na análise de cada coluna, (MÉDIA ± DP) seguidas da mesma letra, representam situações que não apresentaram, entre si, diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de F de Snedecor e de Tukey.

No entanto, poucas vezes foi possível identificar os protozoários, helmintos e artrópodes encontrados ao longo deste trabalho, ainda que ao nível de gênero ou família (Apêndice A). Só em poucas ocasiões foi permitido especular sobre uma natureza parasitária dos contaminantes encontrados nas alfaces, ainda lembrando que poderiam proceder de plantas, de animais e/ou do homem.

Dentre as formas encontradas em hortaliças, pode-se supor a presença de parasitos potencialmente prejudiciais ao homem entre os protozoários e helmintos encontrados (MARCONDES, 2005; NEVES, 2005; PESSOA; MARTINS, 1988; REY, 2008). Embora existam artrópodes parasitos do homem, nenhum deles poderia chegar ao hospedeiro através da ingestão ou manipulação de alfaces (Apêndices F, G e H) (NEVES, 2005; PESSOA; MARTINS, 1988; REY, 2008). Assim, não se pode atribuir atividade parasitária ao homem – e risco sanitário – a nenhum dos insetos, ácaros, crustáceos e outros artrópodes encontrados nesses vegetais. Certamente as numerosas formas encontradas são naturais dos ambientes (terra ou água) de cultivo, refletindo a maciça prevalência desses no planeta, onde são essenciais aos processos ecológicos nos ambientes onde vivem (COPEPODS, 2011; MYERS, 2004).

Também entre os protozoários, numerosas espécies de vida livre dominam os *habitats* em que vivem, isto é, ambientes aquáticos ou terrestres, principalmente os mais úmidos, além das espécies que parasitam animais vertebrados e invertebrados que podem também viver nos mesmos ambientes. Cistos de amebas sugestivos das espécies encontradas no homem foram observados em amostras de alfaces orgânicas (3) e hidropônica (1). No entanto, as mesmas características morfológicas destes cistos são vistas em amebas parasitas de outros animais e até mesmo de vida livre (Apêndice A). Exemplificando, Hoare, em 1959 (apud PESSOA; MARTINS, 1988, p. 190) subdividiu o gênero *Entamoeba* em 4 grupos de espécies segundo o número de núcleos maduros nos cistos, e Neal, em 1966, apenas no grupo *histolytica* (cistos com 4 núcleos), alocou 10 espécies, entre elas duas espécies do homem, duas de tartarugas, uma de serpentes, de peixes, de salamandras, de sapos e rãs, de sanguessugas e até de esgotos (vida livre) (apud PESSOA; MARTINS, 1988, p. 190). Diante disso, conclui-se a precipitação de diversos pesquisadores ao reconhecerem como sendo de *Entamoeba histolytica*, os cistos que encontraram em alfaces e outras hortaliças (CANTOS *et al.*, 2004; DEVERA; BLANCO; GONZALEZ, 2006; FREITAS *et al.*,



2004; MOCELIN; FIGUEIREDO, 2009; MONTANHER *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2008). Além disso, estudos da sobrevivência de patógenos em vegetais evidenciaram que cistos de *Entamoeba histolytica* poderiam permanecer viáveis por apenas três dias, em folhas (MELO, 1978).

Cistos de *Giardia sp.* são mais resistentes que os de *E. histolytica* (NEVES, 2005; PESSOA; MARTINS, 1988; REY, 2008). Foram encontrados duas vezes, em alfaces convencional (1) e orgânica (1), cistos característicos de *Giardia duodenalis* (Apêndice A), agente de giardíase no homem e mamíferos domésticos (cão, gato, bois, carneiros) ou silvestres. Segundo Monis, Caccio e Thompson (2008), além do caráter zoonótico desta espécie, outras giárdias (*G. muris* e *G. microti*, de roedores, *G. agilis*, de anfíbios, *G. ardeae* e *G. psittaci*, de aves) possuem cistos que não diferem dos de *G. duodenalis*. Assim, embora se trate de um parasito, não é possível estabelecer sua verdadeira procedência, neste caso.

Os demais protozoários encontrados nesta pesquisa, principalmente formas trofozoíticas de ciliados, eram de natureza não parasitária, uma vez que estes organismos, a maioria de vida livre, são frequentes nos ambientes dos cultivos (GUPTA; NEATE; LEONARD, 2001; REY, 2008; ROBERT; SCHMIDT, 2005).

Dos helmintos presentes nos exames das alfaces, por 6 vezes foram identificados ovos de *Ascaris sp.* (Apêndice C), nas convencionais (4) e orgânicas (2); contudo não se pode afirmar a espécie, embora exista apenas duas possibilidades, pois estes ovos podem ser de *Ascaris lumbricoides*, do homem, ou de *Ascaris suum*, parasita de suínos. Também encontrou-se uma vez, ovo de *Taenia sp.* (alface convencional), este provavelmente de procedência humana (Apêndice C). Os demais ovos de helmintos não poderiam ser atribuídos a parasitos do homem. No entanto, diversos autores relataram ter encontrado ovos de Ancylostomidae (família que contém espécies parasitas do homem ou de animais) em exames de alfaces (ARBOS, 2009; CANTOS *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2008; SOARES, 2004).

Também visualizou-se por diversas vezes ovos com características semelhantes às dos ancilostomídeos, porém sua etiologia não pode ser de origem humana (Apêndice B). Os ovos desses vermes eliminados nas fezes de seus hospedeiros contém células (blastômeros – 4 ou 8) que, em 24 a 48 horas dão origem a uma larva; após este tempo, já não se encontra mais o ovo, e sim a larva, nas fezes (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003; NEVES, 2005; PESSOA;

MARTINS, 1988; REY, 2008). Portanto, encontrar ovos de ancilostomídeos em alfaces equivale a acreditar que haveria fezes *in natura*, recém emitidas, sobre as mesmas. Além disso, a família Ancylostomidae pertence a um vasto grupo de nematódeos que alberga esta e outras famílias de parasitos de vegetais, ou de espécies de vida livre (clássica ordem Strongylida) que, entre outras características, produzem ovos com este formato (BLAXTER *et al.*, 1998; DE LEY, 2006); nas espécies de vida livre e algumas parasitas, porém, o embrionamento e eclosão dos ovos dá-se lentamente (JOHNSTONE, 2000).

Ao tomar como referência os parasitos do homem observaram-se, por numerosas vezes, larvas semelhantes às dos ancilostomídeos ou às de *Strongyloides stercoralis* (pertence à superfamília Rhabdiasoidea, da clássica ordem Rhabditida). No entanto, mais uma vez não foi possível, a priori, atribuir estas larvas ao homem ou a animais. A atual ordem Rhabditida (DE LEY; BLAXTER, 2004) abriga tanto os ancilostomídeos como os Strongyloides em diferentes sub-ordens – Rhabditina e Tylenchina – respectivamente. Estes são grupos muito abrangentes dos Nematoda, porém que possuem características morfológicas muito próximas, frequentemente indistinguíveis nas larvas (DE LEY, 2006; LOK *et al.*, 2006; MCSORLEY, 2009; SOMMER *et al.*, 2006,). Quase sempre a distinção dos gêneros e espécies destes grupos se baseia na anatomia interna e em aspectos do aparelho reprodutor dos machos e fêmeas adultos, vistos com recursos microscópicos mais sofisticados do que a microscopia ótica simples, ou ainda em características fisiológicas ou genéticas (DE LEY, 2006).

Também as larvas de nematódeos presentes em alfaces, foram frequentemente referidas por diversos autores como pertencentes a *Strongyloides sp.* (ARBOS, 2009; DEVERA; BLANCO; GONZALEZ 2006; FREITAS *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2008; SANTANA, *et al.*, 2006; SOARES, 2004; TAKAYANAGUI *et al.*, 2001). Acredita-se que esta possibilidade existe, porém ela é bastante remota. Desde 1964, Chaia relatava que a resistência das larvas de *Strongyloides stercoralis* no solo é muito pequena, ao contrário das larvas de outros nematódeos, para justificar que suas larvas são raramente encontradas neste ambiente, mesmo em áreas com altos índices de infecção humana; além disso, afirmava que essas larvas vivem pouco tempo na água – a larva rhabditoide, até 24 horas, e a larva filarioide, até 5 dias (apud PESSOA; MARTINS, 1988, p. 514). Outro argumento é que muitos membros das atuais sub-ordens Rhabditina e Tylenchina, já referidas, são habitantes comuns do solo, onde são encontrados em abundância

realizando a reciclagem da matéria orgânica. Alguns pesquisadores no mundo têm se dedicado a demonstrar a influência das comunidades de nematódeos na qualidade dos solos e dos cultivos (LIANG *et al.*, 2005; NEHER, 1999; TOMAZINI; FERRAZ; MONTEIRO, 2008).

A composição dos nematódeos, particularmente os bacterívoros, no solo, depende da vegetação presente, tipo de terreno, quantidade de matéria orgânica disponível, estação do ano e, principalmente, da quantidade e diversidade de bactérias presentes (GUPTA; NEATE; LEONARD, 2001; MACSORLEY, 2009; NEHER, 1999; LOOF, 1964). Caldwell e colaboradores (2003), investigaram *in vitro* a ingestão de *Salmonella enterica* por um nematódeo de vida livre, o *Caenorhabditis elegans*, que ainda proporcionaria à bactéria uma proteção contra a inativação por produtos sanitizantes. Embora não ofereçam risco à saúde humana, podemos sugerir que nematódeos de vida livre bacterívoros poderiam exercer este papel protetor para microrganismos patogênicos nos cultivos de hortaliças onde ambos existam, considerando também o fato de que estes nematódeos excretam íntegras e viáveis, 30 a 60% das bactérias que ingerem (NEHER, 1999). Quando encontramos menor quantidade de nematódeos (larvas/adultos e ovos) em alfaces de cultivo orgânico que nas demais, provavelmente isto foi reflexo da menor quantidade de bactérias, também encontrada nas alfaces orgânicas.

Alguns trabalhos recentes da literatura, realizados na Turquia (CETIN; BINGOL; AKKAYA, 2008; KOZAN *et al.*, 2005) e na Líbia (ABOUGRAIN *et al.*, 2010), ambos países em desenvolvimento, com índices sanitários precários, referem o achado de ovos de *Ascaris*, *Taenia*, *Toxocara*, além de cistos de *Giardia*, às vezes em índices alarmantes (ABOUGRAIN *et al.*, 2010). Foram pesquisados diversos vegetais para consumo cru, inclusive alfaces; estas apresentaram sempre os mais altos índices de contaminação, quando comparadas com os demais: cenoura, pepino, repolho, tomate, cebola, salsa, agrião. Biscaro e colaboradores (2008), no Brasil, detectaram apenas o encontro de nematódeos de vida livre em alfaces americanas irrigadas com águas receptoras de efluentes urbanos. Os nematódeos tendem a permanecer no filme líquido que recobre as partículas de terra (MACSORLEY, 2009); o formato das folhas de alfaces (particularmente no tipo crespa), que são largas, justapostas, flexíveis e nervuradas, permite o maior contato com o solo e, conseqüentemente, maior fixação dos contaminantes, o que também dificulta a higienização (SILVA *et al.*, 2005).

Pelas considerações feitas, mesmo que a maioria dos contaminantes presentes nas alfaces não ofereça riscos à saúde humana, eles são bons indicadores de higiene desses vegetais. A higienização dessas hortaliças é imprescindível, e é muito oportuna a pesquisa de agentes sanitizantes adequados para a remoção de contaminantes – bactérias, fungos, protozoários e helmintos – assim como outros microrganismos e sujidades; ainda que muitos não sejam parasitos do homem, mas de animais ou plantas, ou que nem sequer tenham natureza parasitária.

## 6 CONCLUSÃO

Dos três tipos de alfaces *in natura* analisados, as provenientes de cultivo convencional apresentaram maior contaminação de origem fecal do que as orgânicas e hidropônicas, estando algumas amostras acima do padrão estipulado pela legislação sanitária.

Foi presenciada *Salmonella* sp. apenas nas amostras hidropônicas (20%), estando impróprias ao consumo humano.

As análises parasitológicas revelaram organismos potencialmente patogênicos para o homem: cisto de *Giardia* sp., ovos de *Ascaris* sp. e ovos de *Taenia* sp., com mais ocorrências em alface convencional do que em orgânica e nenhuma presença em alface hidropônica.

Foram ainda detectados cistos de ameba, ovos e larvas de nematódeos morfológicamente análogos aos que se encontra no homem, provavelmente formas de vida livre provenientes do solo.

Foram observadas em abundância formas de vida livre entre os protozoários, os nematódeos, e os artrópodes (estes com destaque nas alfaces hidropônicas) veiculados nas sujidades das alfaces, refletindo a composição dos ambientes de cultivo.

Em vista da alta incidência de protozoários, nematódeos e artrópodes em hortaliças procedentes desses cultivares, ainda que muitos não sejam parasitos do homem, mas de animais ou plantas, ou que nem sequer tenham natureza parasitária, sugerimos que estes sejam referidos como indicadores de higienização, podendo ser usados como referencial na comparação entre diferentes procedimentos.

Quanto ao efeito dos métodos de higienização (Teste e Tradicional) nos três tipos de alfaces, conclui-se que os dois métodos não apresentaram diferença significativa na remoção de coliformes fecais, protozoários, helmintos e artrópodes.

No exame das etapas de higienização, separadamente:

- A etapa de pré-lavagem diminuiu de forma significativa a contaminação por coliformes fecais e por protozoários, helmintos e artrópodes sendo, portanto, importante para preparar a superfície das alfaces para as demais etapas de sanitização;

- A lavagem com detergente, no método teste, mostrou eficácia significativa para redução de coliformes fecais e para a remoção de helmintos os quais podem indicar a presença de formas patogênicas que podem ser transmitidas ao homem. Contudo, para os protozoários e a remoção não foi estatisticamente significativa. Portanto, podemos sugerir o uso do detergente em substituição ao método tradicional.

Finalmente, concluímos que a higienização dessas hortaliças é imprescindível, e é muito oportuna a pesquisa de agentes sanitizantes adequados para a remoção de contaminantes – bactérias, fungos, protozoários e helmintos – assim como outros micro-organismos e sujidades.

Sugerimos que o detergente empregado no procedimento teste pode vir a ser comercializado em nível de varejo.

## REFERÊNCIAS

ABREU, I. M. O. *et al.* Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 30, v. 1, p. 108-118, maio 2010.

ABOUGRAIN, A. K. *et al.* Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. **Food Control**, v. 21, 760–762, 2010.

AMATO NETO, V. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. São Paulo: Elsevier, 2008. 456p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2. ed. Washington: APHA, 2001. 914 p.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 2008. 412 p.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Salmonella. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual Online**. 2006. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso 15 dez. 2009.

ANDRIOLO, J. L. *et al.* Cultivo hidropônico da alface empregando substratos: uma alternativa a NFT? **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 794-798, out./dez. 2004.

ARBOS, K. A. **Qualidade sanitária e nutricional de hortícolas orgânicas**. 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BARNES, D. R.; FOX, R. S.; RUPPERT, E. E.: **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca, 2005. 7 ed.

BENINNI, E. R. Y. *et al.* Manejo do cálcio em alface de cultivo hidropônico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 605-610, out./dez. 2003.

BERBARI, S. A. *et al.* Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 197-201, maio/ago. 2001.

BEUCHAT, L. R.; *et al.* Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruit and vegetables. **Journal of Food Protection**, USA, v.64, n.7, p.1079- 7084, jul./2001.

Disponível em:

<[http://www.sproutnet.com/Research/standardization\\_of\\_a\\_method\\_to\\_d.htm](http://www.sproutnet.com/Research/standardization_of_a_method_to_d.htm)>

. Acesso em: 26 dez. 2010.

BISCARO, G. A. Aspectos sanitários do cultivo da alface americana, irrigada com águas receptoras de efluentes urbanos. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 295-301, jan./fev., 2008.

BLAXTER, M. L.; DORRIS; M.; DE LEY, P. **Nematoda**. Roundworms. Tree of Life Web Project. 2002. Disponível em:<<http://tolweb.org/Nematoda/2472>>. Acesso em: 20 maio. 2011.

BLAXTER, M. L. *et al.* A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, p. 71-75, 1998. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nature/journal/v392/n6671/full/392071a0.html>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

BRASIL. Instrução Normativa n<sup>o</sup>64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal, as listas de substâncias permitidas para uso nos sistemas orgânicos de produção animal e vegetal e sobre extrativismo sustentável orgânico será objeto de regulamentação. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 19 dez. 2008. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=19345>>. Acesso em: 12 de nov. 2009.

\_\_\_\_\_. Instrução Normativa n<sup>o</sup> 5, de 23 de fevereiro de 2007. Aprova as definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes minerais, destinados à agricultura. **Diário Oficial da União**, Poder executivo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 01 jan. 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15\\_88.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm)>. Acesso em: 12 de nov. 2009.

\_\_\_\_\_. Portaria CVS n<sup>o</sup> 6, de 10 de março de 1999. Dispõe os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Secretaria de Estado de Saúde, São Paulo, SP, 6 mar. 1999. Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=20920&word>>. Acesso em: 12 jun. 2004.



\_\_\_\_\_. Resolução - CNNPA nº 12 de 24 julho de 1978. Fixa os padrões de identidade e qualidade para os alimentos (e bebidas). **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_78\\_hortalicas.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_hortalicas.htm)>. Acesso em: 27 mar. 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução Normativa Nº1 de 27 de novembro de 1978. Aprova as normas a serem obedecidas pelos detergentes e seus congêneres. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 27 nov. 1978. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/01\\_78.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/01_78.htm)>. Acesso em: 27 jan. 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviço de alimentação. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 16 set. 2004. Disponível em: <<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=12546>>. Acesso em: 19 nov. 2009.

\_\_\_\_\_. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=alimentos#%2>>. Acesso em: 12 de nov. 2009.

BRUNO, L. M.; PINTO, G. A. S. Aplicação de cloro no preparo de hortaliças frescas para consumo doméstico. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n. 1. p. 259-236, out. 2004.

CABRINI, K. T. *et al.* Pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 95, p. 92-94, abr. 2002.

CADWELL, K. *et al.* *Ingestion of Salmonella enterica Serotype Poona by a Free-Living Nematode, Caenorhabditis elegans, and Protection against Inactivation by Produce Sanitizers.* 2003. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7. p. 4103-4110, jul. 2003. Disponível em:<<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/69/7/4103>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

CANTOS, G. A. *et al.* Estruturas parasitárias encontradas em hortaliças comercializadas em Florianópolis, Santa Catarina. **Rev NewsLab**, v. 66, p. 154-63, 2004.

CARLESSO, A. M. **Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes do Hospital das Clínicas de Porto Alegre-RS**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CASTRO, G. A. **Helminths**: structure, classification, growth, and development. In:\_\_\_\_\_. NCBI Books. cap. 86. Texas: The University of Texas Medical Branch em Galveston, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

CENCI, S. A. *et al.* Boas práticas de processamento mínimo de vegetais. In: NETO, F. N. (Org.). **Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Disponível em: <[http://smap.mda.gov.br/documentos/Documentos/Manual\\_Boas\\_Praticas.pdf](http://smap.mda.gov.br/documentos/Documentos/Manual_Boas_Praticas.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2011.

CETIN, O.; BINGOL, E. B.; AKKAYA, H. The Microbiological, Serological and Parasitological Quality of Cig Kofte (Raw Meatball) and Its Lettuce Marketed in Istanbul. **Polish J. of Environ. Stud.**, v. 17, n. 5, p. 701-706, abril. 2008.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

COELHO, E. M.; ROSA, O. O.; LIMA, M. G. Avaliação da qualidade microbiológica de alface (*Lactuca sativa* L. ) em plantio direto e hidropônico. **Higiene alimentar**, v. 149, n. 21, p. 94-98, mar. 2007.

COELHO, L. P. S.; OLIVEIRA, S. M.; MILMAN, M. H. A. *et al.* Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.5, p. 479-482, 2001.

COMETTI, N. N. *et al.* Efeito da concentração da solução nutritiva no crescimento da alface em cultivo hidropônico-sistema NFT. **Horticultura Brasileira.**, v. 26, n. 2, p. 262-267, abr./jun. 2008.

COPEPODS: Copepoda - Physical Characteristics, Habitat, Behavior And Reproduction. **Animal Life Resource**. 2011. Disponível em: <<http://animals.jrank.org/pages/1868/Copepods-Copepoda.html>>. Acesso em: 25 maio. 2011.

COSTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. M. R. Diagnóstico do cultivo hidropônico de hortaliças na região do Distrito Federal. **Horticultura brasileira**, v. 18, n. 1, mar. 2000.

COX, F. E. G. **Modern parasitology**: a textbook of parasitology. 2 ed. USA: Wiley-Blackwell, 1993. 288 p.

CIENTÍFICA E INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (CSIRO). **Nematoda research at CSIRO**. Australia, 2009. Disponível em: <<http://www.csiro.au/science/Nematode-Research.html#1>>. Acesso em: 27 dez. 2010.

CUNHA, F. A. **Deteção de betalactamases de espectro expandido (ESBL) em cepas de coliformes isolados de hortaliças minimamente processadas, comercializadas na cidade de Fortaleza – Ceará**. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

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

DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. In \_\_\_\_\_. **WormBook**. USA: Department of Nematology, University of California, 2006. Disponível em: <<http://www.wormbook.org/>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. **Nematology Monographs and Perspectives**. v. 2, p. 633–653, 2004

DEVERA, R.; BLANCO, Y.; GONZALEZ, H. Parásitos intestinales en lechugas comercializadas en mercados populares y supermercados de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 26, n.2, p.100-107, 2006.

FAYER, R., DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S., "Zoonotic protozoa: from land to sea", **Trends in Parasitology**, v. 20, n11, p. 53-536, 2004.

FAVARO-TRINDADE, C. S. *et al.* Efeito dos sistemas de cultivo orgânico, hidropônico e convencional na qualidade de alface lisa. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 111-115, abr./jun. 2007.

FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S.. **Fundamentos biológicos da parasitologia humana**. Barueri, SP: Manole, 2003. 156 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 418 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FREITAS, A. A. *et al.* Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do município de Campo Mourão, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 381-384, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. In.\_\_\_\_\_. Salmonella. USA: FDA, 2007. cap. 5. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.ht>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

GARCIA, J. L. *et al.* Evaluation of helminthes and protozoa in raw vegetables produced in Umuarama, Paraná State. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.7, p.7-10, 2004.

GASPARINI, E. Antônio; PORTELLA, R. B. **Manual de parasitoses intestinais**. Rio de Janeiro, RJ: Rubio, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de Alimentos**. 3. ed. rev. amp. Barueri, SP: Manole, 2008.

GOULART, A. M. C. **Análise de dados em estudos de diversidade de nematódeos**. Planaltina, DF: EMBRAPA, 2009. 46 p. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/download/1505/t>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

GUILHERME, A. L. F. *et al.* Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 405-411, jul./ago. 1999.

GUIMARÃES, A. M. *et al.* Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n.5. p. 621-623, set./out., 2003.

GUPTA, V.V.S.R.; NEATE, S.M.; LEONARD, E. **Life in the soil**. Australia: Cooperative Research Centre for Soil & Land Management, 2001. 12p. Disponível em: <[http://www.sustainablegrowthtexas.com/resource/Gupta\\_CSIRO\\_Understanding\\_Life\\_in\\_the\\_Soil.pdf](http://www.sustainablegrowthtexas.com/resource/Gupta_CSIRO_Understanding_Life_in_the_Soil.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2008.

IBD CERTIFICAÇÕES. **Diretrizes para o padrão de qualidade orgânico IBD**. 17 ed. São Paulo, 2009. 127p.

JAIGOBIND, A. G. A.; AMARAL, L.; JAISINGH, S. **Hidroponia**. Curitiba: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas/Instituto de Tecnologia do Paraná, 2007. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br>>. Acesso em: 16 maio 2008.

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

JOHNSTONE, C. **Parasites and Parasitic Diseases of Domestic Animals**. University of Pennsylvania, 2000. Disponível em: <[http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Nematodes/nems\\_5.htm](http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Nematodes/nems_5.htm)>. Acesso em 12 abr. 2011.

JUATEN, S. K. Avaliação microbiológica de alface oferecida em restaurante universitário. In: Congresso de Iniciação Científica, 19, 2010, Pelotas, RS. **Anais eletrônicos...** Pelotas: UFPEL, 2010. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/cs.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

KIONTKE; K. SUDHAUS, W. Ecology of *Caenorhabditis* species. In\_\_\_\_\_. **WormBook**. USA: Department of Nematology, University of California, 2006. Disponível em:

<[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_ecolCaenorhabditis/ecolCaenorhabditis.pdf](http://www.wormbook.org/chapters/www_ecolCaenorhabditis/ecolCaenorhabditis.pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2011.

KOZAN, E. *et al.* Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. **Food Control**, v. 16, n. 3, p. 239-242, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713504000416>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, S.L. The sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*. Puerto Rico **Journal of Public Health**, v.9, p. 283-291, 1934.

LEITE, A. I. **Prevalência da contaminação e avaliação dos fatores de risco para enteroparasitos em hortaliças de Fortaleza - CE.** 2000. 91 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

LIANG, W. *et al.* Diversity and Dynamics of Soil Free-Living Nematode Populations in a Mediterranean Agroecosystem. **Science Press Beijing**, v. 15, n.2, p. 204-215, 2005.

LIMA, F. S. L. **Produção de orgânicos: a inserção da pequena propriedade no contexto econômico, social e ambiental.** 2005. 55 f. Monografia (Graduação em Ciências Agrônomicas) - Faculdade de Ciências Econômicas e Administrativas de Presidente Prudente, Faculdades Integradas, Presidente Prudente, SP, 2005.

LIMA, M. E. L. **Avaliação do desempenho da cultura da alface (*Lactuca sativa*) cultivada em sistema orgânico de produção, sob diferentes lâminas de irrigação e coberturas do solo.** 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

LINHARES, R. **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 239-256.

LOK, J. B. *et al.* *Strongyloides stercoralis*: a model for translational research on parasitic nematode biology. In \_\_\_\_\_. **WormBook**. USA: Department of Nematology, University of California, 2006. Disponível em: <<http://www.wormbook.org/>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

LOOF, P.A.A. Free-living and plant-parasitic nematodes from Venezuela. **Nematologica**. v. 10, n. 2, p. 201-300, 1964. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/brill/nem/1964/00000010/00000002/art0000>>. Acesso em: 24 abr. 2011.

LUTZ, A. V. *Shistossoma mansonii* e schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 7, p. 121-125, nov., 1919.

LUZ, G. L. **Frequência de irrigação no cultivo hidropônico da alface**. 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MACSORLEY, R. **Soil Nematodes**. The University of Florida. 2009. Disponível em: <[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/soil\\_nematode.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/soil_nematode.htm)>. Acesso em: 12 maio. 2011.

MAGGI, M.F. *et al.* Produção de variedades de alface sob diferentes potenciais de água no solo em ambiente protegido. **Irriga**. v. 11, n.3, p. 415-427, 2006.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 219-224, set./dez. 2001.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2005.

MARIANO, A. M. S. E.; TEIXEIRA A. N. S.; OKURA, M. H. Eficiência de desinfecção para o tratamento “minimamente processado” de alface cultivada em meio hidropônico. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 2, p. 68 - 78, 2005. Disponível em: <<http://www.fazu.br/ojs/index.php/fazuemrevista/article/view/141/135>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

MARTINES, E. **Legislação em hidroponia**. Curitiba: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas/Instituto de Tecnologia do Paraná, 2008. Disponível em: <<http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt-referencial5700.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2010.

MARTINS, A. C. A. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) comercializada na cidade de Bananeiras-PB. In: JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 3., 2008, Bananeiras, PB. **Anais eletrônicos...** Bananeiras: UFPB, 2008. Disponível em: <[http://www.seminagro.com.br/trabalhos\\_publicados](http://www.seminagro.com.br/trabalhos_publicados)>

/3jornada/02ciencia\_tecnologia\_de\_alimentos/CTA0220.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2009.

MASSARA, C. L. *et al.* Atividade de detergentes e desinfetantes sobre a evolução dos ovos de *Ascaris lumbricoides*. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 335-340, jan./fev. 2003.

MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Calanoida (Copepoda) species composition changes in the reservoirs of São Paulo State (Brazil) in the last twenty years. **Hydrobiologia**, v. 504, n. 1-3, p. 215-222, 2003.

MELO, J. A. S. Aplicação de águas residuárias no solo como um método de tratamento, disposição final e reciclagem das águas usadas. **Revista de Engenharia Sanitária**, v. 17, p. 82-91, 1978.

MELLO, J. C. *et al.* Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida de prateleira de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 418-426, set./dez. 2003.

MYERS, P. **Arthropoda**. Museum of Zoology, University of Michigan 2004. Disponível em: <<http://www.eol.org/pages/164>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

\_\_\_\_\_. **Introduction to the Platyhelminthes**. UNIVERSITY OF CALIFORNIA MUSEUM OF PALEONTOLOGY. 2000. Disponível em: <<http://www.ucmp.berkeley.edu/platyhelminthes/platyhelminthes.html>>. Acesso em: 12 maio. 2011.

\_\_\_\_\_. **Phylum Nematoda**. Animal Diversity Web. 2009. Disponível em: <[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/soil\\_nematode.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/soil_nematode.htm)>. Acesso em: 12 maio. 2011.

\_\_\_\_\_. **Trematoda**. Animal Diversity Web. 2001. Disponível em: <<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Trematoda.html>>. Acesso em: 12 maio. 2011.

MOCELIN, A. F. B.; FIGUEIREDO, P. M. S. Avaliação microbiológica e parasitológica das alfaces comercializadas em São Luís – MA. **Revista de Investigação Biomédica do Uniceuma**, n.1, p. 97 - 107, 2009.



MOGHARBEL, A. D. I.; MASSON, M. L. Perigos associados ao consumo da alface, (*Lactuca sativa*), in natura. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 83-88, jan./mar. 2005.

MONIS; P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, A. R. C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93-100, 2008.

MONTANHER, C. C. *et al.* Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes self-service por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista Estudos de Biologia**, v. 29, n. 66, p. 63-71, jan./mar. 2007.

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

NASCIMENTO, M. S. *et al.* Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal Food Technology**, v.6, n.1, p.63-68, jan./jun., 2003a.

[NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6656) (NCBI). **Taxonomy DataBase**. [U.S. National Library of Medicine](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6656), 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6656>>. Acesso em: 12 abril. 2011.

NASCIMENTO, M. S. *et al.* Avaliação comparativa da eficácia de cloro, vinagre, ácido acético e ácido peracético na redução da população de microrganismos aeróbios mesófilos em verduras e frutas. **REVNET DTA**, São Paulo, v. 3, n. 6, p. 222-230, nov. 2003b.

NASCIMENTO, M. S. *et al.* Effect of different disinfection treatments on natural microbiota of lettuce. journal of food protection. **Journal of Food Protection, USA**, v. 66, n. 9, p. 1697-1700, 2003c.

NEAL, R.A. Experimental studies on Entamoeba with reference to speciation. **Advances in Parasitology**, v. 4. p.1-51, 1966.

NEIL, C. J. **The Roundworms**: Phylum Nematoda. Biodiversity Project. 2004. Disponível em: <<http://www.personal.psu.edu/users/n/c/ncj111/>>. Acesso em: 22 maio. de 2011.

NEHER, D. Nematode Communities in Organically and Conventionally Managed Agricultural Soils. **Journal of Nematology**, v. 31, n. 2. p. 142 - 154. 1999.

NETO, L. *et al.* **Microbiologia e parasitologia**: uma contribuição para a formação de profissionais da saúde. 2. ed. Goiás: AB Editora, 2008. 136 p.

NETO, S. E. A.; FERREIRA, R. L. F.; PONTES, F. S. T. Rentabilidade da produção orgânica de cultivares de alface com diferentes preparos do solo e ambiente de cultivo. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1362-1368, ago, 2009.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 428p.

NIKAIDO, M. *et al.* Analysis of bacteria, parasites, and heavy metals in lettuce (*Lactuca sativa*) and rocket salad (*Eruca sativa L.*) irrigated with treated effluent from a biological wastewater treatment plant. **Biological Trace Element Research**, v.134 , p. 342–351. jul, 2010.

OHSE, S. *et al.* Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidropônia. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 181-185, jan./mar. 2001.

ORMOND, J. G. P. *et al.* Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. **BNDES Setorial**, n. 15, p. 3-34, mar. 2002.

PACHECO, L. G.; MARTINS, A. V. A importância das amebas de vida livre. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 57-65, jan-jun. 2008.

PARTELLI, D. P.; GONÇALVES, A. G. **Pesquisa de parasitas intestinais em folhas de alfaces (*Lactuca sativa L.*) comercializadas no município de Vitória – ES**. Vitória: Faculdade Brasileira UNIVIX – Curso de Farmácia, 2005. Disponível em: <[http://www.deomarbitten court.com.br/files/tcc\\_contaminacao.pdf](http://www.deomarbitten court.com.br/files/tcc_contaminacao.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2009.

PAULA, N. R. F. *et al.* Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras – MG, Brasília – DF e São Paulo – SP. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 219-227, jan./fev. 2009.

PAULA, P. *et al.* Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes *self-service*, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 36, n. 4, p. 535-537, jul./ago. 2003.

PEDROSA, M. T. M. Agricultura **familiar sustentável**: conceitos, experiências e lições. 2000. 110 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) - Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

PELKCZAR, M. J.; *et al.* **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron, 1997. 482 p.

PENTEADO, S. R. **Introdução à agricultura orgânica**: normas e técnicas de cultivo. Campinas: Grafimagem, 2000. 110 p.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

PINTO, A. R. C. **Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas**: uma revisão. 2007. 49 f. Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. 888p.

ROBERT, L. S.; SCHMIDT, G. D. **Foundations of parasitology**. 7 ed. USA: Mc Graw Hill Higher Education, 2005, 702p.

ROCHA, A.; MENDES, R.A.; BARBOSA, C.S. *Strongyloides* spp e outros parasitos encontrados em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializados na cidade do Recife, PE. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 151-160, 2008.

SANTANA, L. R. R. *et al.* Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 264-269, abr./jun. 2006.

SANTOS, R. H.S. *et al.* Conservação pós-colheita de alface cultivada com composto orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 521-525, mar. 2001.

SCHIMAICHEL, G. L.; RESENDE, J. T. A importância da certificação de produtos orgânicos no mercado internacional. **Revista Eletrônica Lato Sensu**, v. 2, n. 1, jul. 2007. Disponível em:

<[http://web03.unicentro.br/especializacao/Revista\\_Pos/P%C3%A1ginas/2%20Edi%C3%A7%C3%A3o/Agrarias/PDF/1-Ed2\\_CA-Importa.pdf](http://web03.unicentro.br/especializacao/Revista_Pos/P%C3%A1ginas/2%20Edi%C3%A7%C3%A3o/Agrarias/PDF/1-Ed2_CA-Importa.pdf)>. Acesso em: 10. jan. 2011.

SEDIYAMA, M. A. N.; PEDROSA, M. W. Hidroponia: uma técnica alternativa de cultivo. **Cultivo protegido de hortaliças em solo e hidroponia**, Belo Horizonte, v. 20, p. 200-201, maio. 1999.

SILVA, C. G. M. *et al.* Ocorrência de *Cryptosporidium spp.* e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 63-69, set./ dez. 2005.

SILVA, M. A.; ROSA, J. A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 2, p.242-246, jan.2003.

SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 632 p.

SILVA, N. *et al.* Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, maio/ago. 2003.

SILVA, V. P. B. V. **Análise da conformação de qualidade da alface orgânica certificada produzida no Distrito Federal**. 2005. 164 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

SILVA JUNIOR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SOARES, B. **Ocorrência de estruturas parasitárias em hortaliças**. 2004. 78f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SOARES, B.; CANTOS, G. A. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 377-384, dez. 2005.

\_\_\_\_\_. Avaliação de agentes químicos indicados para descontaminação de hortaliças. **Saúde em Revista**, Piracicaba, v. 8, n. 19, p 45-49, 2006.

SOMMER, R. J. *et al.* Evolution of development in nematodes related to *C. elegans*. In\_\_\_\_\_. **WormBook**. USA: Department of Nematology, University of California, 2006. Disponível em: < <http://www.wormbook.org/>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

SOMINEZ, T. C. O. *et al.* **Adubação verde**. Brasília: Embrapa. 2007. Disponível em:<[http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie\\_documentos/outros/adubacao\\_verd.pdf](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/outros/adubacao_verd.pdf)>. Acesso em: 30 dez. 2010.

SOUZA, J. P. *et al.* Desempenho agroeconômico do consórcio alface e beterraba sob sistema orgânico. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 44., 2006. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2006. p. 1-14.

SOUZA, P. A. *et al.* Características químicas de alface cultivada sob efeito residual da adubação com composto orgânico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n.3, p. 754-757, jul./set. 2005.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. In\_\_\_\_\_. **WormBook**. USA: Department of Nematology, University of California, 2006. Disponível em: < [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_strainmaintain/strainmaintain.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html)>. Acesso em: 12 abr. 2011.

REZENDE, F. V. *et al.* **Cultivo de alface em cultivo orgânico de produção**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2007. Disponível em: <[http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie\\_documentos/publicacoes2008/ct\\_56.pdf](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2008/ct_56.pdf)>. Acesso em: 14 dez. 2009.

TAKAYANAGUI, O.M.; *et al.* Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n.1, p.37-41, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v34n1/4316.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

TAKEUCHI, K; FRANK, J. F. Quantitative determination of structures Escherichia coli O157: H7 in lettuce leaves and the role of protection of chlorine to disinfect. **Journal of Food Protection**, USA, v. 64, n. 2, p. 147-151, feb. 2001. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=904715>>. Acesso em: 14 dez. 2009.

TANAKA, T. T.; DEVICO, R. B. M.; FELIPE, D. F. Condições microbiológicas de alfaces comercializadas em feiras-livres da cidade de Maringá, PR. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 6., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: Centro Universitário de Maringá, 2009. p. 1-5.

TAVARES, J. A.; SARAIVA, F. Z. **Qualidade Microbiológica e Composição Química da Alface Crespa de Diferentes Sistemas de Cultivo**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição), Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel-PR, 2006.

TESTOLIN, G. **Avaliação da alface hidropônica utilizando água misturada com diferentes porcentagens de soluções nutritiva**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agronomia – Universidade de São Paulo. 2009.

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

TOMAZINI, M. D. ; FERRAZ, L. C. C. B. ; MONTEIRO, A. R. Abundância e diversidade de nematóides em áreas contíguas de vegetação natural e submetidas a diferentes tipos de uso agrícola. **Nematologia Brasileira**, v. 32, p. 185-192, 2008. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20323/220-230%20co.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2010.

UNDERSTATING EVOLUCION. **Introdução aos artrópodes**. 2004. Disponível em: <<http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/arthropodstory>>.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS). **Alface (Lettuce - Lactuca sativa L.)**. Rio Grande do Sul: Faculdade de Agronomia, 2010. Disponível em: <[http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.ufrgs.br/agrofitossan/galeria/imagens/fotos/166-99-rice2003-12-10\\_0001.JPG&imgrefurl=http://www.ufrgs.br/agrofitossan/galeria/busca.asp&usq=\\_\\_rI4UJG7Gx1L78j3JvVI-a8gOybQ=&h=480&w=640&sz=73&hl=pt-BR&start=2&zoom=1&um=1&itbs=1&tbnid=isLwPnb0AFsNUM:&tbnh=103&tbnw=137&prev=/search%3Fq%3DALFACE%2BRAIZ%26um%3D1%26hl%3Dpt-BR%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DG%26rls%3Dorg.mozilla:pt-BR:official%26biw%3D1280%26bih%3D520%26tbn%3Disch&ei=DY4wTpORKaPd0QGq0umFAw](http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.ufrgs.br/agrofitossan/galeria/imagens/fotos/166-99-rice2003-12-10_0001.JPG&imgrefurl=http://www.ufrgs.br/agrofitossan/galeria/busca.asp&usq=__rI4UJG7Gx1L78j3JvVI-a8gOybQ=&h=480&w=640&sz=73&hl=pt-BR&start=2&zoom=1&um=1&itbs=1&tbnid=isLwPnb0AFsNUM:&tbnh=103&tbnw=137&prev=/search%3Fq%3DALFACE%2BRAIZ%26um%3D1%26hl%3Dpt-BR%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DG%26rls%3Dorg.mozilla:pt-BR:official%26biw%3D1280%26bih%3D520%26tbn%3Disch&ei=DY4wTpORKaPd0QGq0umFAw)>. Acesso em: 22 jul. 2011.

WISNIEWSKY, M.A., GLATZ, B.A., GLEASON, M.L., REITMEIER, C.A. Reduction of E. coli O157:H7 counts on whole fresh apples by treatment with sanitizers. **Journal of Food Protection**, USA, v. 63, n. 6, p. 703-708, 2000.

YURI, J. E. *et al.* Comportamento de cultivares de alface americana em Santo Antônio do Amparo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 870-874, out./dez. 2005.

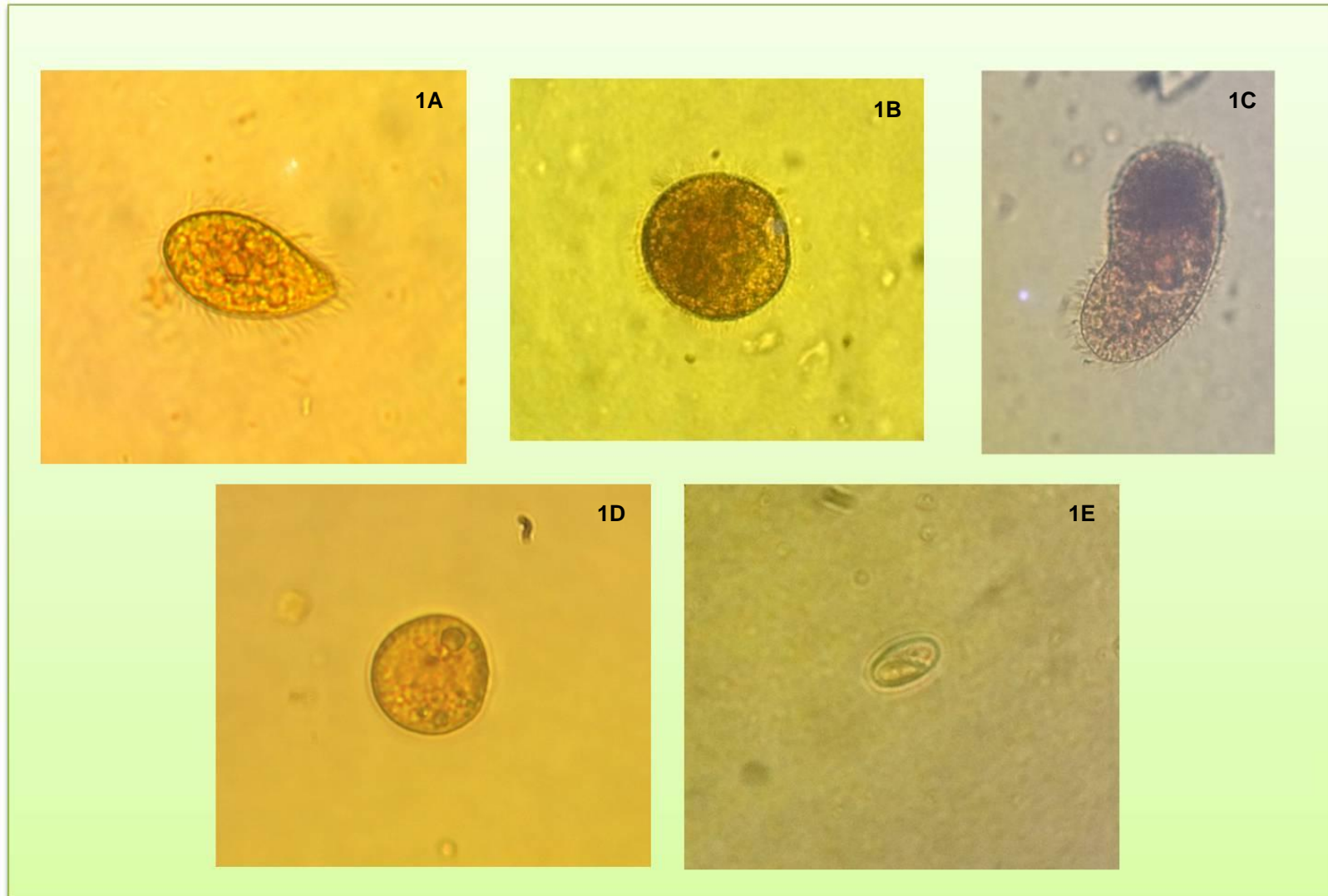
YURI, J. E. *et al.* Efeito de composto orgânico sobre a produção e características comerciais de alface americana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 127-130, jan./mar. 2004.

KIONTKE; K. SUDHAUS, W. Ecology of *Caenorhabditis* species. In\_\_\_\_\_.  
**WormBook**. USA: Department of Nematology, University of California, 2006.  
Disponível em:  
<[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_ecolCaenorhabditis/ecolCaenorhabditis.pdf](http://www.wormbook.org/chapters/www_ecolCaenorhabditis/ecolCaenorhabditis.pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2011.

**APENDICE**

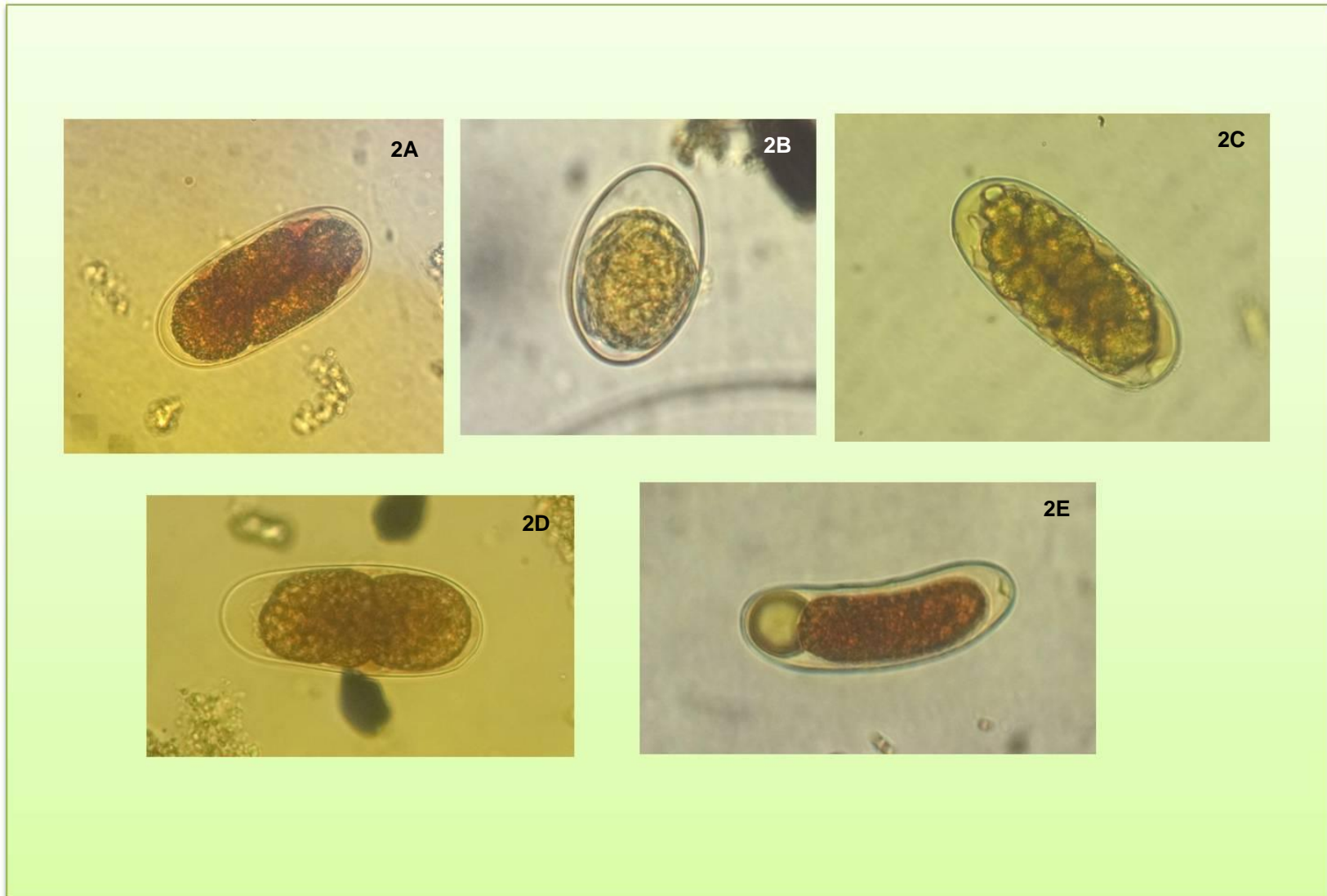


## Apêndice A



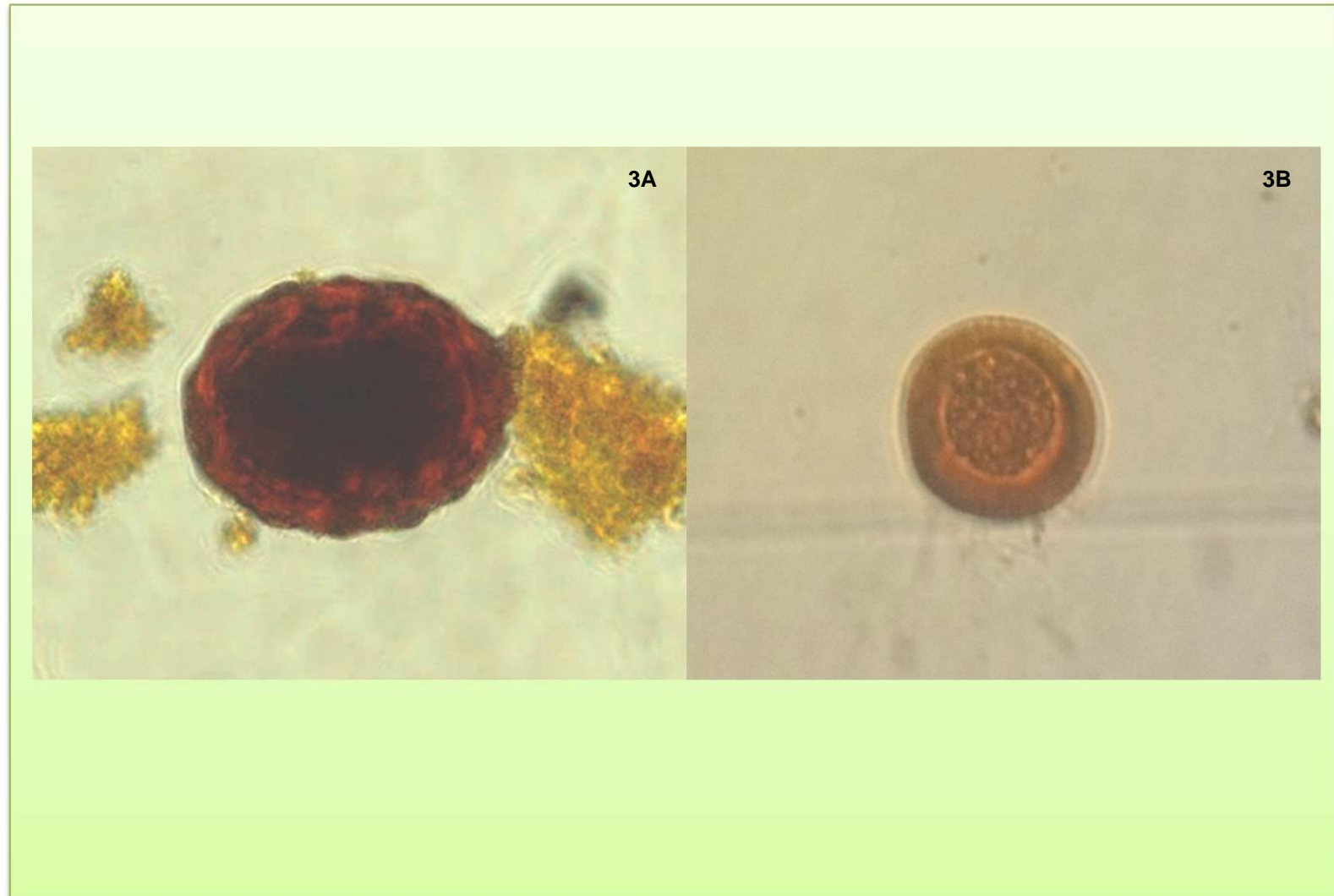
Prancha 1 – Imagens de protozoários encontrados nas alfaces de cultivo convencional, orgânico e hidropônico. Imagens 1A, 1B e 1C de protozoários de natureza não parasitária. Imagem (1D) sugestiva para cisto de *Entamoeba* sp. e imagem (1E) sugestiva para cisto de *Giardia* sp.

## Apêndice B



Pancho 2 – Imagens de ovos de helmintos encontrados nas alfaces de cultivo convencional, orgânico e hidropônico. Imagem (2A) com características semelhantes às dos Ancilostomídeos. Imagem (2E) sugestiva para ovo de *Meloidogyne* sp. Imagens 2B, 2C e 2D não identificados quanto a espécie.

## Apêndice C



Prancha 3 – Imagens de ovos de helmintos encontrados nas alfaces provenientes de cultivo convencional: ovo de *Ascaris sp.* (3A) e ovo de *Taenia sp.* (3B).

## Apêndice D



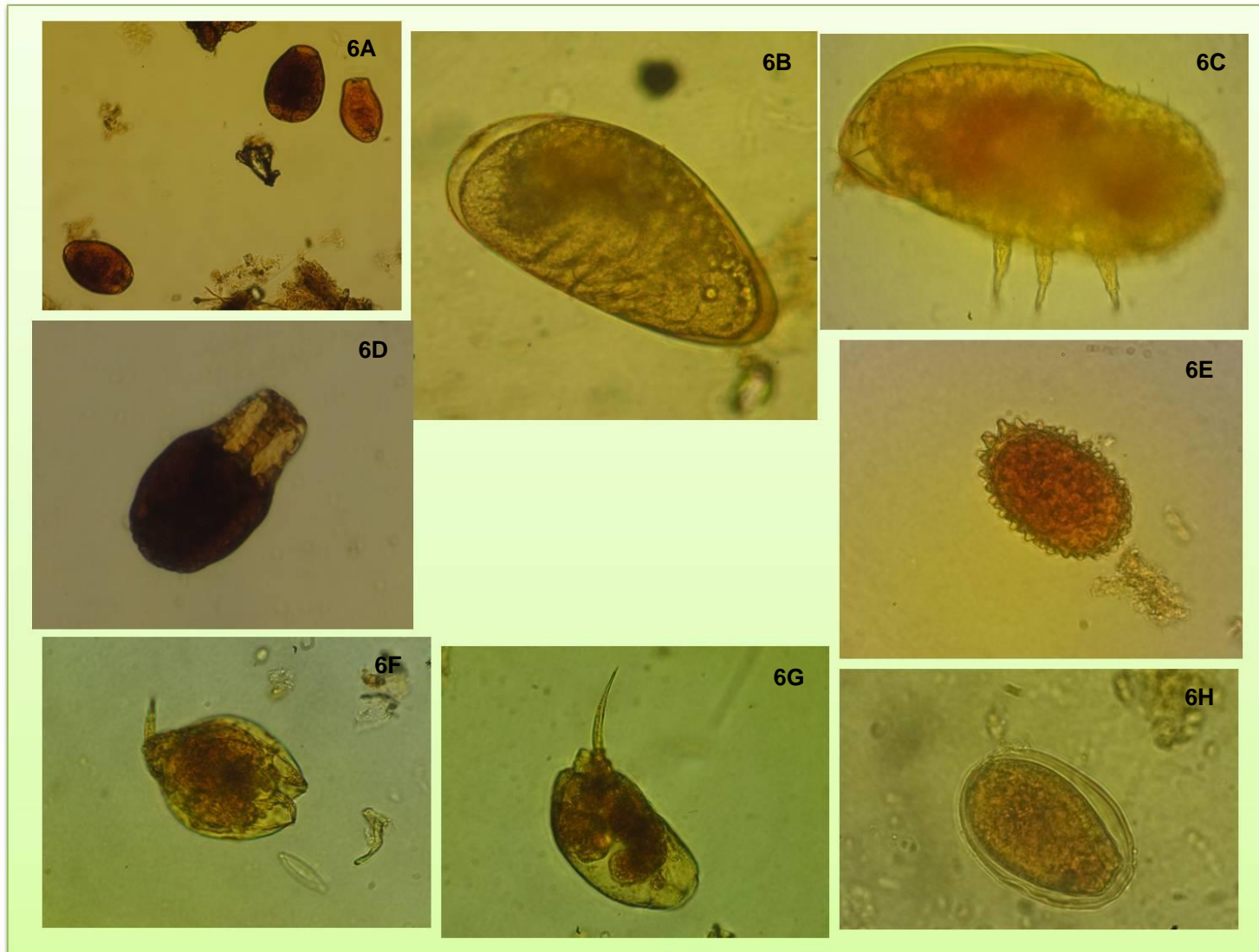
Prancha 4 – Imagens de larvas e ou formas adultas de helmintos encontrados nas alfaces provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico.

## Apêndice E



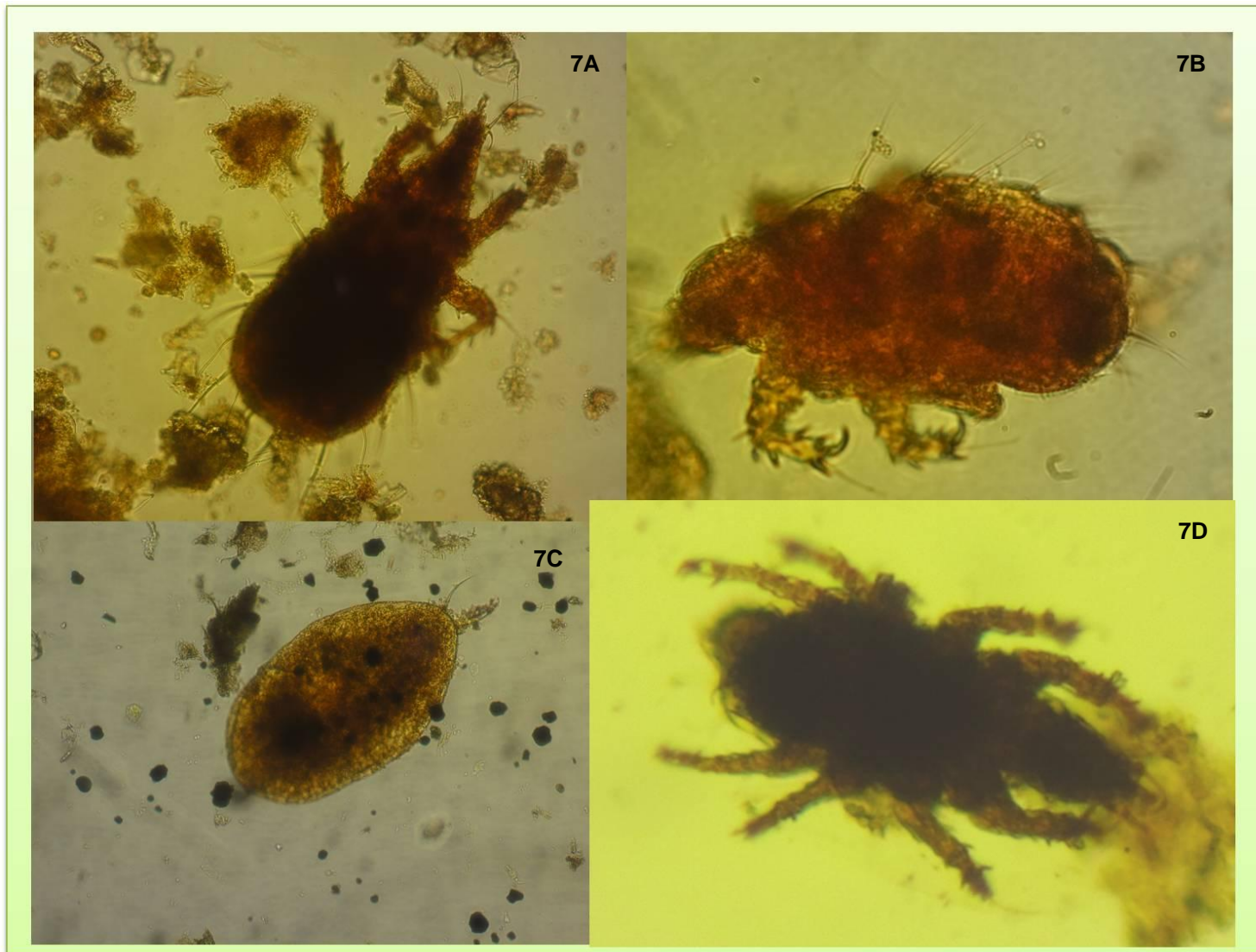
Prancha 5 – Larvas e ou formas adultas de helmintos encontrados nas alfaces provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico. Imagem (5C): detalhe do aparelho reprodutor dos machos (bolsa copuladora e espículos). Imagem 5D: detalhe do vestibulo bucal e esôfago.

## Apêndice F



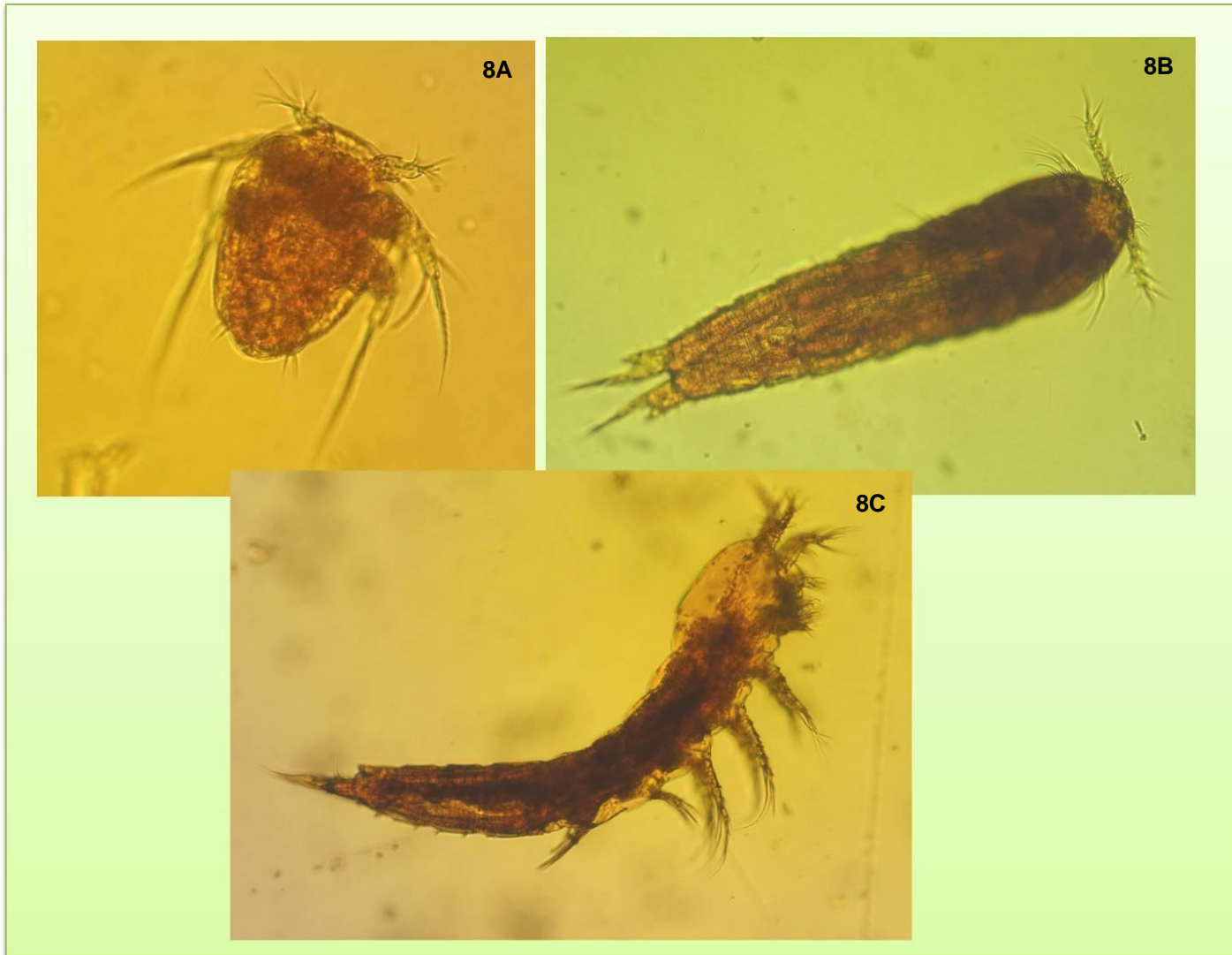
Prancha 6 – Imagens sugestivas para ovos de artrópodes encontrados nas alfaces provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico.

## Apêndice G



Prancha 7 – Imagens sugestivas para larvas ou formas adultas de artrópodes encontrados nas alfaces provenientes de cultivo convencional, orgânico e hidropônico.

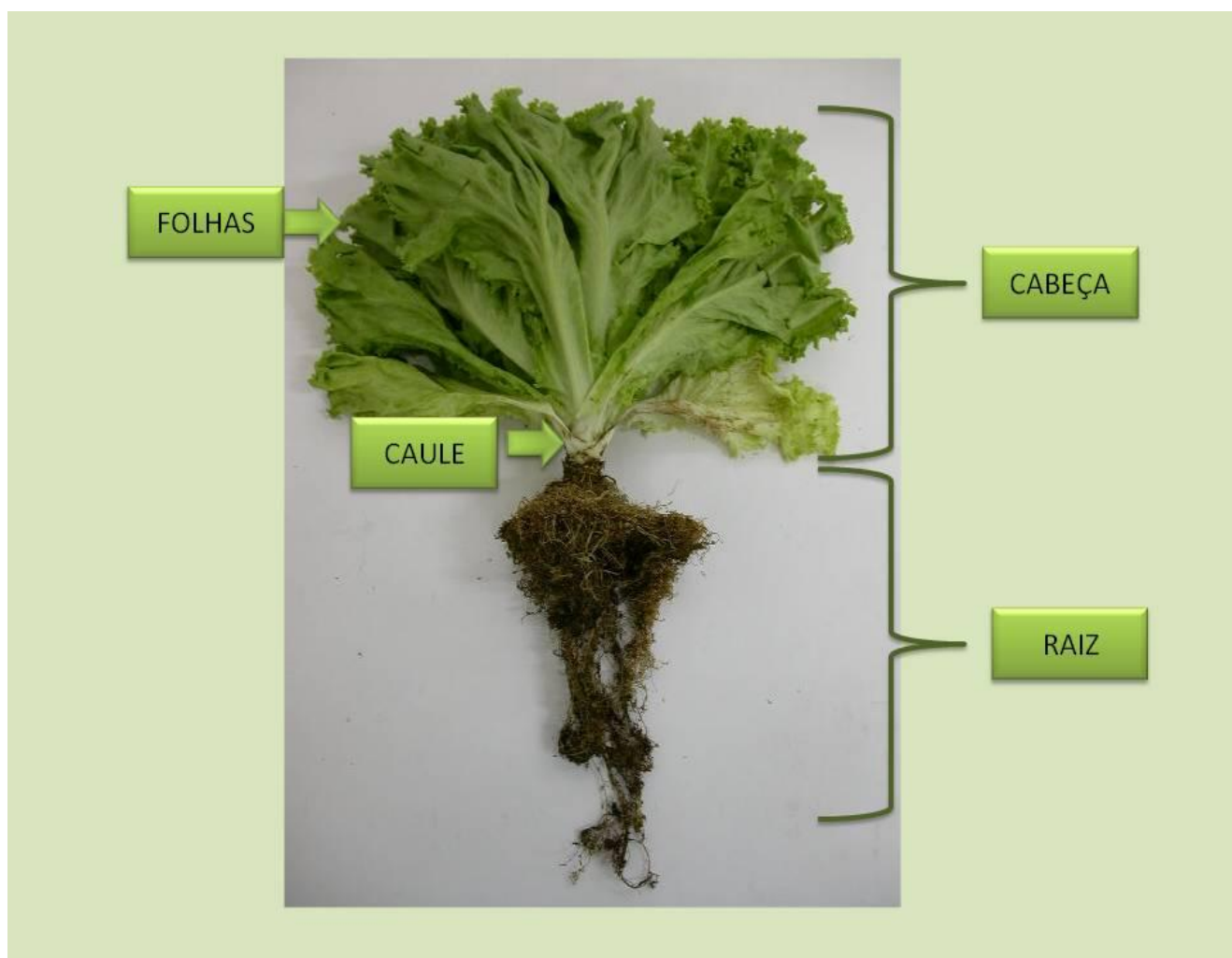
## Apêndice H



Prancha 8 – Imagens sugestivas para larvas ou formas adultas de artrópodes (copépodes) encontrados nas alfaces provenientes de cultivo hidropônico.



**ANEXO**

**ANEXO A – Morfologia da Alface (*Lactuca sativa* L.)**

Fonte: Adaptado de UFRGS (2010).

**ANEXO B – Tipos de Cultivares da Alface (*Lactuca sativa* L.)  
conforme Mogharbel e Masson (2005)**



Alface Crespa ou “*Iceberg*”



Alface Manteiga



Alface Romana



Alface Folhosa

Fonte: Adaptado de Mogharbel e Masson (2005)