

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**NELSON JUSTINO GOMES NETO**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ALFACES (*Lactuca sativa*)**  
**OBTIDAS EM CULTIVOS TRADICIONAL, ORGÂNICO E**  
**HIDROPÔNICO**

**JOÃO PESSOA - PB**  
**2011**

**NELSON JUSTINO GOMES NETO**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ALFACES (*Lactuca sativa*)  
OBTIDAS EM CULTIVOS TRADICIONAL, ORGÂNICO E  
HIDROPÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janeeyre Ferreira Maciel**

**JOÃO PESSOA - PB  
2011**

G633a Gomes Neto, Nelson Justino.  
*Avaliação microbiológica de alfaces (Lactuca sativa) obtidas em cultivos tradicional, orgânico e hidropônico / Nelson Justino Gomes Neto.-- João Pessoa, 2011.*  
67f. : il.  
Orientador: Janeeyre Ferreira Maciel  
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCT  
1. Alface (Lactuca sativa). 2. Alface – avaliação - qualidade microbiológica. 3. Sanitizantes. 4. Sistema de cultivo.

UFPB/BC

CDU: 635.52(043)

**NELSON JUSTINO GOMES NETO**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ALFACES (*Lactuca sativa*)  
OBTIDAS NOS CULTIVOS TRADICIONAL, ORGÂNICO E  
HIDROPÔNICO**

Dissertação \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /2011.

Dissertação apresentada em cumprimento aos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Suely Madruga – PPGCTA/CT/UFPB**  
**Coordenador da Banca Examinadora**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marciane Magnani – PPGCTA/CT/UFPB**  
**Examinador Interno**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Francisca Inês de Sousa Freitas – DF/CCS/UFPB**  
**Examinador Externo**

***Ao meu bom Deus,***  
*Inesgotável fonte de misericórdia, amor e graças em*  
*minha vida.*

***Aos meus pais, Fabrício (in memoriam) e Gizélia,***  
*Por tudo o representam em minha vida*

***Aos meus avôs, Procópio (in memoriam) e Gidélia***  
*Razões de minha existência e exemplos personificados*  
*de amor, simplicidade, luta e dedicação, que sempre*  
*levarei como legado*

***Dedico.***

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu inefável amor, incomensuráveis bênçãos e inestimável fonte de força na incessante busca dos objetivos e anseios da minha vida. Ainda que eu falasse todas as línguas do globo terrestre e fosse o homem mais sábio de todo o universo, jamais seria capaz de exprimir com toda exatidão e eloquência toda minha gratidão por tudo o que tens feito.

À Gizélia, minha mãe, pela educação, incentivo ao saber e principalmente por seu infindável amor maternal, refletidos por gestos e palavras de estímulo e carinho.

À Fabrício, meu pai. Apesar do ínfimo contato vivenciado, cultivo felizes e acalentadoras lembranças de sua pessoa ao meu lado, tornando-o sempre especial, vivo e inesquecível em minha mente.

À Dona Dada, minha eterna voinha, que a muito deixou de ser a razão de meu viver, para se tornar toda a minha vida. Os meus mais nobres e próceros ensinamentos foram lecionados por sua simplicidade e principalmente por seu desmedido amor demonstrados para com todos aqueles que tiveram o prazer e felicidade de se fazerem presentes ao seu redor.

Ao meu querido voinho Procópio, suas limitações físicas e neurológicas jamais o privaram de me conferir seu infinito afeto e momentos da mais profusa alegria. Suas inebriantes aventuras, fábulas e anedotas jamais fenecerão em minha mente.

À Dona Nedit (*in memorian*), minha outra voinha, por sua admirável fé em Deus, dedicação e amor aos seus familiares.

Ao meu irmão Juninho, apesar das inextinguíveis divergências, meu amor e admiração por você são incondicionais. Minha vida não teria sentido se você não fizesse parte dela.

Aos tios Bibil, Tatal, Lula, Chinda, Fábio, Flávio (*in memorian*), Beto, Girlene, Celinha, Rosa, Maria, Luciana, Fabiana, e Tuta pelo imenso carinho, afeto e orgulho por mim nutridos em especial por tia Fabíola (*in memorian*) por me conduzir ao fantástico mundo da leitura e a Tia Eliza por me afagar com seu amor e em muitas circunstâncias financiar meus regalos.

À minha aprazível, cômica e espirituosa madrinha Loura, por sempre me oferecer seu desvelo.

Às centenas de milhares de primos e primas, por toda contribuição direta e/ou indireta.

Ao impolutíssimo e sisudo professor Evandro Leite de Souza, pela honrosa oportunidade de tê-lo como tutor e orientador acadêmico, demasiada confiança e, sobretudo pelo inexorável aprendizado transmitido. Se um dia Deus me agraciar com 20% de sua sapiência e dedicação, tornar-me-ei um profissional completamente realizado.

À professora Marciane Magnani, por ser o professor Evandro Leite de Souza na versão feminina. Meu trabalho jamais seria concluído se não obtivesse seu apoio, repasse de ensinamentos e carinho.

À professora Inês Freitas, por disponibilizar o seu laboratório e sempre colaborar para a consecução de minhas pesquisas. Absolutamente INÊstimável em minha jornada.

À professora Marta Madruga, por sua idoneidade, dinamismo e eficiência na viabilização deste trabalho.

À professora Maria Lúcia, por ser a mais acolhedora e maravilhosa docente da UFPB.

À professora Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, por inserir-me no meio científico. Jamais me esquecerei da oportunidade e confiança a mim depositadas.

Aos técnicos de laboratório Gilvandro e Júnior, pelo assaz apoio e auxílio na realização das análises.

As singulares Renata Maynard e Inês Queiroga, pela responsabilidade, entusiasmo e dedicação expressados em horas infindáveis de labor durante a condução de todas as etapas deste trabalho. Sem vocês, jamais conseguiria concluir todos os experimentos em tempo hábil.

À Júlio Abrantes, pela gentileza de transmitir seus conhecimentos microbiológicos.

À Érika Teixeira, pela esmera contribuição quando minhas pesquisas ainda estavam engatinhando.

Aos colegas de turma da pós-graduação pela amizade, cooperação, incentivo e pelos bons momentos de convívio.

Aos professores da pós-graduação, pelos saberes outorgados, dedicação e significativa contribuição na condução das disciplinas, aparando arestas e servindo de prumo para moldar nossos conhecimentos.

Ao amigo Carlos Eduardo, pela aprazível amizade e companheirismo desde outrora e, principalmente por seu excelente e assustadoramente apurado talento para fazer dos meus slides e apresentações verdadeiras obras cinematográficas. Seria omissos e até mesmo leviano se olvidasse da apoplética mamanguapense Larissa Sousa por sua presteza de contribuir na formatação e criação de meus trabalhos.

À Ana Caroliny e Geyseanny Fernandes, por me proporcionarem ao longo desses tantos anos de amizade, indescritível apoio, companheirismo, dedicação e cumplicidade em tantas situações. Jamais serei capaz de precisar meu carinho, fascínio e admiração por vocês.

À Maria Eugênia, minha perene princesinha, por me apresentar um universo espetacular cheio de vida, aventuras e emoções (do qual nunca mais sai) e a Nara Raquel, querida irmã. À todas vocês, devoto um profuso apreço.

À Jossana Sousa e Sonnalle Costa, símbolos de inteligência, dinamismo e dedicação, á quem procuro sempre me espelhar.

Aos amigos de graduação Walber Schildt, Anderson Miná, Tamires Alcântara, Jaciene Janne, Anna Júlia e Amanda Marques, pela amizade, carinho, estadia de afáveis recordações e claro, pela troca de experiências que certamente levarei como ensinamento.

Ao grupo de pesquisa do curso de Nutrição da UFPB composto por, Nereide Serafim, Ana Júlia Libi, Helena Tchá, Vanessa Gonçalves, Geíza Azerêdo, Adassa Tavares, Camila Milão, Ilsa Cunha, Polyana Campos, Sonale Carolina e em especial a minha irmã adotiva Isabelle Luz, pelos agradabilíssimos diálogos relevantes ao crescimento profissional e de cunho científico acerca das mais diversas temáticas do cenário internacional.

Aos meus melhores amigos, Edno Galderisy, Higor Gabriel, Marcio Pacheco e Júnior Rodrigues, por me propiciarem a honra, prazer e divertimento de algumas das mais épicas, maravilhosas, agradáveis e hilárias lembranças de minha vida, que certamente ficarão para sempre no mais íntimo e cativo de meu ser.

Ao grande Diego Melo, pela amizade conquistada e agradável convívio nas mais diversas peripécias vivenciadas.

À filantrópica entidade e confraria “MASTIGADORES”, onde numa verdadeira demonstração de altruísmo ao próximo, abdica do bem-estar próprio para abrandar a tristeza alheia e assim conferir ao seu semelhante, inesquecíveis momentos de felicidade e regozijo, permitindo-me desta forma, contribuir para a construção de um mundo melhor.

Aos serelepes amigos Laires Jr, Rodolfo Almeida, Jean Lima, Júnior Crato, Heitor Matos, Luana Carla, Paula Lima, Isis e Jéssica Trindade, por me permitirem, de maneira peculiar, suportar os mais adversos e extenuantes momentos vivenciados ao longo de meu Mestrado.

Aos não menos queridos, Hallita Avelar, Cely Modesto, Elze Rodrigues, Renato Tavares, Fernando Júnior, Maciel Ramalho, Ianna Lôba, Leandro Duarte, Diego Mernick, Allan Patrick, Pedro Henrique, Laryssa Costa, Cynthia Layse, Léo Baby, Emmily Gérsica, Alan Lívio, Alisson Sena, Hermesson Teixeira, Rodrigo Bandeira, Rodrigo Mendes, Luiz Henrique Louis, Abel Gomes, Cleidiane Araújo, Fagner Serrano, Dominique Moura, Letícia Ingrid, Amanda e Rafaela Maciel, pelo afetuoso carinho e companheirismo, demonstrados pelas mais diversificadas formas.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro, favorecendo assim o estímulo a pesquisa e condições de contribuir com a pesquisa nacional e internacional.

Á todos, os meus mais tenros e sinceros agradecimentos!

## RESUMO

A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa de maior consumo no Brasil, entretanto pode estar associada à veiculação de micro-organismos patogênicos ao homem. O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de amostras de alfaces variedade crespa, obtidas a partir dos sistemas de cultivo tradicional, orgânico e hidropônico comercializadas na cidade de João Pessoa, Paraíba e verificar a eficácia da lavagem com água destilada estéril e dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 150 ppm e ácido acético a 1% na redução de sua carga bacteriana. Foram analisadas 60 amostras para cada sistema de cultivo, distribuídas igualmente entre os ensaios bacteriológicos e parasitológicos, perfazendo um total de 180 espécimes. Para as análises bacteriológicas, as amostras foram submetidas à determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e pesquisa de *Salmonella* sp. Na realização dos ensaios parasitológicos através de sedimentação espontânea, foram pesquisadas estruturas primárias de protozoários e helmintos. Não foi detectada *Salmonella* sp. nas amostras analisadas, independente do sistema de cultivo. Porém, os resultados evidenciaram elevada contaminação por bactérias aeróbias mesófilas e coliformes totais nas amostras de cultivo tradicional e orgânico, as quais também apresentaram contagens de coliformes termotolerantes acima do preconizado pela legislação brasileira em 66% e 80% das amostras, respectivamente. Para as amostras dos cultivos tradicional e orgânico também foi observada alta frequência de enteroparasitos, incluindo as espécies patogênicas *Taenia* sp. e *Entamoeba histolytica*. Em contrapartida, apenas 20% das amostras de alface hidropônica estavam contaminadas por enteroparasitos. A higienização com água estéril foi suficiente para reduzir a carga bacteriana a níveis seguros apenas nas amostras hidropônicas, já, os sanitizantes testados foram eficazes para redução das contagens bacterianas em todos os cultivos.

**Palavras chave:** Alface; Sanitizantes; Sistema de cultivo.

## ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa*) is the increased consumption of leafy vegetables in Brazil, however may be associated with the transmission of pathogenic microorganisms to human. The present study was to evaluate the microbiological quality of samples of curly lettuce variety, obtained from the traditional farming systems, organic and hydroponic sold in the city of João Pessoa, Paraíba, and verify the effectiveness of washing with sterile distilled water and sodium hypochlorite sanitizers 150 ppm and 1% acetic acid to reduce their bacterial load. We analyzed 60 samples for each cropping system, equally distributed between the bacteriological and parasitological tests, totaling 180 specimens. For bacteriological analyses, the samples were subjected to the determination of most probable number (MPN) of total and thermotolerants coliforms, total counts of mesophilic aerobic microorganisms and *Salmonella* sp. In holding the tests using spontaneous sedimentation parasitological, were surveyed primary structures of protozoa and helminthes. *Salmonella* sp. was not detected in the samples analyzed, regardless of cropping system. However, the results showed high contamination by mesophilic aerobic bacteria and total coliforms in samples of conventionally grown and organic, which also showed fecal coliforms counts higher recommended by the Brazilian legislation in 66% and 80% of the samples, respectively. For samples of traditional and organic crops was also observed high frequency of intestinal parasites, including pathogenic species *Taenia* sp. and *Entamoeba histolytica*. In contrast, only 20% of hydroponic lettuce samples were contaminated with intestinal parasites. The cleaning with sterile water was sufficient to reduce the bacterial load to safe levels only in hydroponic samples, already tested sanitizers were effective in reducing bacterial counts in all crops.

**Keywords:** Lettuce; Sanitizers; system cropping.

## LISTA DE QUADROS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Quadro 1.</b> | Consumo alimentar <i>per capita</i> anual (kg) de hortaliças nas diferentes regiões brasileiras .....                     | 14 |
| <b>Quadro 2.</b> | Principais países produtores de alface em 2009 .....  | 16 |
| <b>Quadro 3.</b> | Aspectos gerais de uso de alguns ácidos orgânicos com ação antimicrobiana utilizados como conservadores alimentares ..... | 30 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Cultivares de alfaces tipo crespa: A= cultivar Vanda; B= cultivar Veneza; C= cultivar Vera; D= cultivar verônica ..... 20
- Figura 2.** Distribuição do consumo da alface nas diferentes regiões brasileiras ..... 21
- Figura 3.** Estrutura química clássica e tridimensional do ácido acético ..... 34

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Counting range of microorganisms found in samples of lettuce ( <i>Lactuca sativa</i> ) obtained from different cropping systems, in the city of João Pessoa, Brazil .....           | 46 |
| <b>Tabela 2.</b> | Sanitizing treatments effects on the mesophilic aerobic bacteria counts in lettuces samples obtained from different cropping systems .....  | 50 |
| <b>Tabela 3.</b> | Sanitizing treatments effects on enumeration ( $\log_{10}$ MPN/g) of Total Coliforms (TC) and thermotolerant (TTC) in lettuces samples obtained in different cropping systems ..... | 50 |
| <b>Tabela 4.</b> | Frequency of intestinal parasites lettuce samples obtained from different cropping systems, in the city of João Pessoa, Brazil .....  | 51 |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 11 |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 13 |
| 2.1 HORTALIÇAS .....  | 13 |
| 2.2 ALFACE .....  | 14 |
| 2.2.1 Considerações, Produção, Comercialização e Consumo .....  | 14 |
| 2.2.2 Sistemas de cultivo .....   | 18 |
| 2.2.3 Importância na alimentação e valor nutricional .....  | 20 |
| 2.3 CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS .....  | 21 |
| 2.4 CONTAMINAÇÃO POR ENTEROPARASITOS .....  | 26 |
| 2.5 HIGIENIZAÇÃO E SANITIZAÇÃO DE HORTALIÇAS .....  | 27 |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 33 |
| 3.1 DELIAMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM .....  | 33 |
| 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES SANITIZANTES .....   | 34 |
| 3.3 ENSAIOS DE HIGIENIZAÇÃO .....   | 34 |
| 3.4 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS .....  | 35 |
| 3.4.1 Determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes .....  | 35 |
| 3.4.2 Contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas .....   | 35 |
| 3.4.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp .....  | 36 |
| 3.5 ANÁLISE PARASITOLÓGICA .....  | 36 |
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 37 |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | 38 |
| 4.1 ARTIGO – Microbiological quality of lettuce ( <i>Lactuca sativa</i> ) from different production systems ..... | 38 |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 57 |
| <b>6 REFERÊNCIAS</b> .....  | 58 |

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de hortaliças folhosas proporciona inúmeros benefícios à saúde, mostrando uma correlação direta com a redução de doenças crônicas como hipertensão, diabetes, aterosclerose e câncer, (LOPÉZ-GALVÉZ et al., 2010). No Brasil, dentre as hortaliças folhosas, a mais consumida é a alface (*Lactuca sativa*), que representa em torno de 40% do volume total comercializado nas centrais de abastecimento (FERNANDES, 2002). O consumo desta hortaliça é favorecido por ser fonte de fibras, minerais e vitaminas A, B1, B2, B6 e C; possuir propriedades laxativas, diuréticas e lenitivas, além de propiciar sabor agradável e refrescante (KESKINEN et al., 2009).

A alface, entretanto, pode veicular bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* (MAGKOS et al., 2003) e enteroparasitas a exemplo da *Giardia lamblia*, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica* e *Strongyloides stercoralis* (DARYANI et al., 2008), uma vez que é irrigada frequentemente com água contaminada por matéria fecal ou mesmo adubada com dejetos humanos e/ou animais (TAKAYANAGUI et al., 2001). Assim sendo, torna-se essencial que os vegetais sejam sanitizados através do uso de procedimentos padronizados para que não confirmem risco aos consumidores (SANT'ANA et al., 2002).

O cultivo da alface é praticado nos sistemas tradicional, orgânico e hidropônico, os quais apresentam características diferenciadas na produção, podendo influenciar nas propriedades desta hortaliça (MIYAZAWA et al., 2001). O método tradicional se caracteriza pelo cultivo da alface no solo, com uso de agrotóxicos e fertilização, que pode ser química. Por sua vez, o método hidropônico se caracteriza pelo cultivo da planta em tubos plásticos, por onde circula uma solução com fertilizantes químicos e nutrientes dissolvidos. Neste sistema, a hortaliça permanece protegida de fatores adversos do meio ambiente como chuvas, geadas, ventos fortes e outros fatores, favorecendo a sua produtividade (SANTANA et al., 2006). Em contrapartida, a agricultura orgânica surge como alternativa à agricultura altamente mecanizada e rica em insumos industriais como sistema de produção que evita ou exclui o uso de pesticidas ou agrotóxicos, fertilizantes de composição sintética, reguladores de crescimento, ou outros contaminantes químicos (GUADAGNIN et al., 2005).

Estudos realizados em diversas regiões do Brasil e do mundo indicam problemas de qualidade microbiológica em alfaces comercializadas, tanto por coliformes termotolerantes quanto por enteroparasitas nos cultivos tradicional ou orgânico, porém poucos são os que realizam nos três sistemas juntos (GUIMARÃES et al., 2003; TAKAYANAGUI et al., 2001). Condições sanitárias precárias nas áreas rurais e urbanas favorecem a transmissão desses patógenos, especialmente por meio da água de irrigação e do adubo utilizado na fertilização, que podem estar contaminados por dejetos animais e/ou humano (TAKAYANAGUI et al., 2001).

A lavagem e sanitização antes do consumo é a única medida para redução dos riscos ocasionados pelos contaminantes biológicos em hortaliças como a alface (NOGUEIRA, 2005). Para sanitização dos vegetais, o cloro é amplamente utilizado, geralmente na forma de hipoclorito de sódio (YURI, 2004). Outro agente sanitizante amplamente empregado em âmbito doméstico é o ácido acético, utilizado na forma de vinagre, em diluições variadas (LÜCK; JAGER, 2002).

Neste contexto, o conhecimento dos micro-organismos patogênicos presentes na alface oriunda de diferentes sistemas de cultivo fornece dados importantes sobre as condições higiênicas de sua produção, armazenamento, transporte e manuseio, podendo disponibilizar informações que subsidiem a tomada de medidas que permitam o controle das condições higiênico-sanitárias do sistema de produção (SANTANA et al., 2006). Porém, estes dados são escassos na literatura e são poucas as informações comparativas sobre os níveis de contaminação da alface oriunda dos cultivos tradicional, orgânico e hidropônico de uma mesma região (TAKAYANAGUI et al., 2001).

Diante desta realidade, o presente trabalho realizou uma avaliação microbiológica de amostras de alface variedade cressa, provenientes dos sistemas de cultivo tradicional, orgânico e hidropônico, comercializadas na cidade de João Pessoa-PB e verificou a eficiência da aplicação do ácido acético e hipoclorito de sódio na redução da sua carga bacteriana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HORTALIÇAS

Os vegetais foram os primeiros alimentos do homem. A palavra vegetal originou-se do verbo em latim *vegere*, que significa revigorar. As hortaliças compõem este grupo, sendo geralmente cultivadas em hortas e compreendendo as partes comestíveis das plantas (raízes tuberosas, tubérculos, caules, folhas, flores, frutos e sementes). Popularmente são conhecidas como verduras e legumes e têm um papel importante na mesa do brasileiro por serem fontes de fibras, vitaminas e minerais (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; PRADO et al., 2008).

Segundo a designação oficial (BRASIL, 2002) “Hortaliça é a planta herbácea da qual uma ou mais partes como tubérculos, raízes, rizomas, bulbos, talos, brotos, folhas, inflorescências, pecíolos, frutos, sementes e cogumelos cultivados, são utilizadas como alimento na sua forma natural”. CHITARRA; CHITARRA (2005) por sua vez afirma que “hortaliças são partes de plantas que não pertencem ao grupo de frutas e cereais e que são consumidas frescas, cruas ou processadas”. Enquanto PIF (2006) conceitua hortaliças como “diferentes partes da planta consumidas frescas como saladas ou preparadas de diferentes maneiras”. Assim, o termo hortaliça designa de forma genérica as plantas herbáceas empregadas na alimentação humana.

Os vegetais são, por excelência, fontes de nutrientes, que são substâncias essenciais ao bom funcionamento do organismo humano, de modo que auxiliam a digestão e o funcionamento dos diversos órgãos sendo, por isso, considerados alimentos protetores da saúde (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Esses vegetais são muito utilizados na alimentação humana desde eras antigas pelo sabor que conferem tanto quando consumidas cruas quanto quando incorporadas a outros alimentos (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; FRÖDER, et al., 2007).

Geralmente as hortaliças são utilizadas em acompanhamentos frios e quentes, além de uso em saladas (FERREIRA, 2004; SILVA et al., 2007). Segundo Rosa, Martins; Folly (2001) a preocupação da população com a saúde e o interesse em se ter uma vida saudável tem levado ao aumento do consumo de hortaliças, principalmente com o atual aumento da obesidade no mundo inteiro.

O consumo *per capita* de hortaliças no Brasil apresenta a média de 27,1 kg/ano e de suas regiões, a Sul é a que aduz os maiores valores (Quadro 1). Essas médias são bastante inferiores àquelas observadas em outros países, principalmente da Europa, Ásia e América do Norte onde o consumo *per capita* atinge aproximadamente 100 a 110 kg/ano (SMANIOTO et al., 2009). Por outro lado tem-se notado um aumento de 6 a 10% nas quantidades consumidas pela população brasileira, que pode ser devido às mudanças de hábitos de vida e alimentar da população (MAROUELLI et al., 2000).

| Regiões brasileiras | Consumo de hortaliça kg/ano |
|---------------------|-----------------------------|
| Norte               | 19,4                        |
| Nordeste            | 22,1                        |
| Sudeste             | 28,0                        |
| Sul                 | 38,6                        |
| Centro-oeste        | 26,7                        |

**Quadro 1:** Consumo alimentar *per capita* anual (kg) de hortaliças nas diferentes regiões brasileiras.

**Fonte:** Pesquisa de Orçamento Familiar (POF)-IBGE/2008-2009.

No que se refere à produção de hortaliças, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial da cadeia produtiva de frutas, legumes e verduras, e embora ainda seja uma das cadeias menos desenvolvida, este mercado possui uma perspectiva de crescimento muito mais favorável que os grãos (MACHADO, 2002). Em 2004 o mercado de hortaliças atingiu um valor de produção estimado em aproximadamente R\$ 12 bilhões.

## 2.2 ALFACE

### 2.2.1 Considerações, Produção, Comercialização e Consumo

A alface é uma hortaliça folhosa pertencente à família *Asteraceae* conhecida desde 500 anos antes de Cristo. Originária da Europa e Ásia foi trazida para o Brasil pelos portugueses (EMBRAPA, 2011). Seu efeito calmante se deve a lactupicrina

e a lactucina, sendo no Brasil a hortaliça folhosa de maior consumo. A média *per capita* de consumo é de quase dois quilos por ano, representando 40% do gasto total com verduras destinadas a compra da alface. A cultura da alface apresenta alto grau tecnológico, sendo comuns as práticas de produção em estufa, hidroponia e cultivo orgânico, que permitem obter vegetais de qualidade durante o ano todo (BRASIL, 2011).

Botanicamente esta hortaliça caracteriza-se por ser uma planta herbácea, apresentando caule curto, não ramificado, ao qual se prendem as folhas. A alface possui formato variado, sendo as do tipo “repolhudo” as mais consumidas no Brasil. A coloração das folhas varia de verde escuro a verde amarelado, existindo atualmente também com folhas roxas. As raízes são do tipo pivotante, com ramificações finas e curtas, não ultrapassando os 25 cm de solo (BRASIL, 2011).

Por ser originária de clima temperado a alface tem um bom desenvolvimento da fase vegetativa em condições de clima mais ameno resistindo até as geadas leves. Entretanto a fase reprodutiva, que se inicia com o pendoamento inicia-se em temperaturas mais elevadas e em dias longos (BRASIL, 2010). Vale ressaltar que o cultivo em temperaturas inferiores a 10°C e precipitações pluviométricas prolongadas retardam o crescimento e danificam as plantas (SEGOVIA et al., 1997). Por sua vez, o cultivo em temperaturas superiores a 25°C reduz a fase vegetativa promovendo o pendoamento precoce (BRASIL, 2010). As temperaturas de ar mais favoráveis ao crescimento e produção de alface situam-se entre 15 e 24°C, sendo a mínima de 7°C (SEGOVIA et al., 1997).

A alface é classificada nas seguintes variedades: Americana, Lisa Mimosa e Crespa (SAKATA, 2007). Esta última é a mais consumida, caracterizando-se pelo grande porte, miolos cheios, uniformes e com alto rendimento; as folhas são bem repicadas e de coloração verde claro ao verde escuro (CARVALHO, 2008). A alface americana é caracterizada por apresentar cabeça crespa, com as folhas internas cor creme, folhas imbricadas como as do repolho, consistentes e quebradiças, com nervura destacada e aspecto geral pouco delicado (MOTA et al., 2001). A variedade lisa caracteriza-se pelo grande porte, cabeças compactas, folhas de coloração verde claro e arredondada, alta uniformidade e alto rendimento no acondicionamento. A alface mimosa é caracterizada pela excelente uniformidade da planta, das folhas e tamanho, com coloração verde brilhante (SAKATA, 2007).

A colheita da alface ocorre entre 50 e 90 dias após a sementeira, quando as folhas ainda são tenras, sem início de florescimento. O corte deve ser rente ao solo, no final da tarde. Após a colheita eliminam-se raízes e folhas velhas e danificadas, procedendo então a lavagem, descartando plantas refugo (MOTA et al., 2001).

De acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO (2011), a produção mundial de alface em 2009 foi em torno de 23,7 milhões de toneladas, distribuídas por uma superfície de 1 milhão de hectares. A China foi o maior produtor com cerca de 12,85 milhões de toneladas/ano, o que representou aproximadamente 52% de toda a produção do globo terrestre, seguido dos Estados Unidos com 17,3% (QUADRO 2), Europa com 15% (destacando-se a Espanha e Itália como principais produtores) e América do Sul com apenas 1%.

O Brasil possui aproximadamente 35000 hectares plantados com alface, caracterizados pela produção intensiva, pelo cultivo em pequenas áreas e por produtores familiares, gerando cerca de cinco empregos diretos por hectare (COSTA; SALA, 2005) e sua produção gira em torno de 526 mil toneladas anuais (IBGE, 2009). Todos os estados do país produzem alface, porém os maiores produtores são os estados de São Paulo e Minas Gerais (CARVALHO, 2008).

De acordo com o Instituto de Economia Agrícola (2007), o valor da produção agrícola da alface em 2005 foi de R\$ 33.388.035,15 milhões, o que representa uma média de 1,7% sobre o PIB do Brasil em 2005 e 8,3% sobre o PIB da agricultura. Apesar de estes valores significarem pequena participação, quando comparados com o valor da produção de outras culturas, a atividade apresenta-se como uma opção interessante de mercado para pequenos produtores (CARVALHO, 2008). No entanto, devido à alta perecibilidade 19% da alface são perdidos no embalamento inadequado, 17% no transporte e 10% no manuseio (CARVALHO FILHO et al., 2009).

| <b>Países</b>                     | <b>Produção (em toneladas)</b> |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| <u>República Popular da China</u> | 12.855.000                     |
| <u>Estados Unidos</u>             | 4.104.000                      |
| <u>Espanha</u>                    | 1.000.000                      |
| <u>Itália</u>                     | 850.000                        |
| <u>Índia</u>                      | 790.000                        |

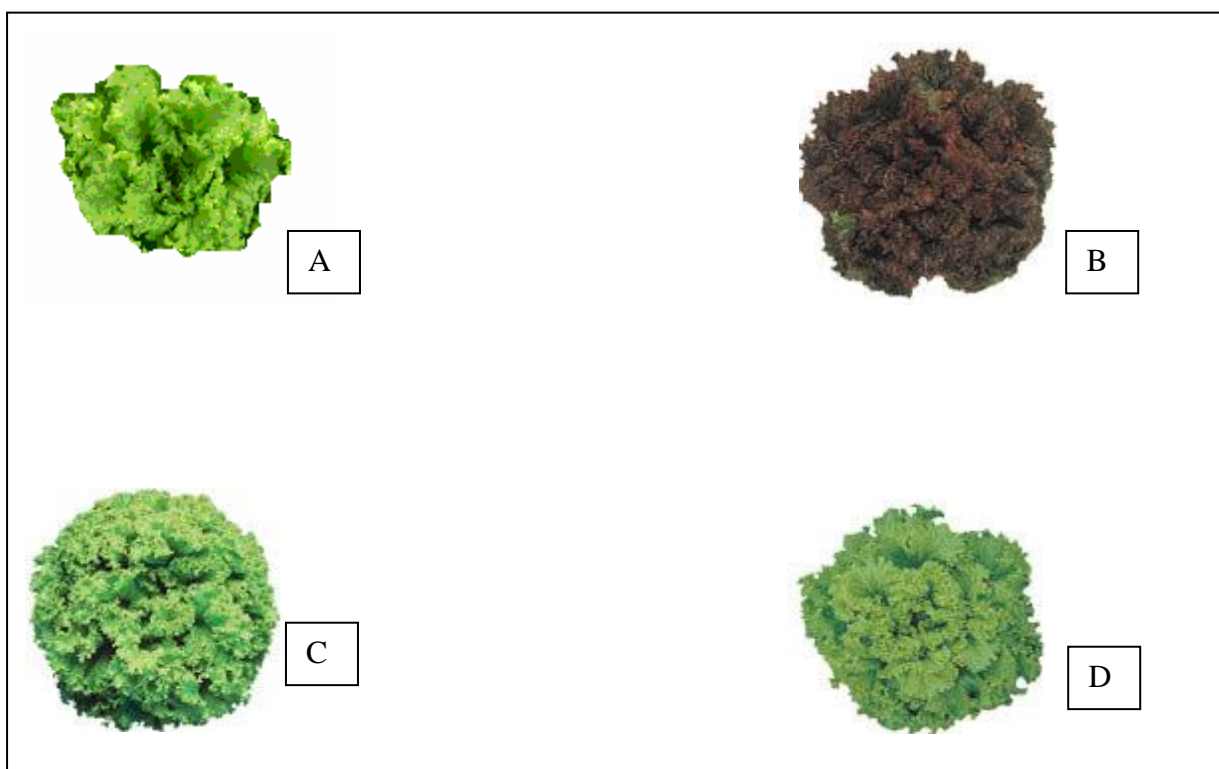
**Quadro 2:** Principais países produtores de alface em 2009.

**Fonte:** Fao (2011).

No Brasil, toda produção é comercializada por meio de feiras livres, mercado públicos, sacolões, mercadinhos e supermercados. De início a comercialização de hortaliças era preponderante em feiras-livres, porém com a participação do comércio varejista moderno nas vendas de produtos frescos, a procura por alfaces em feiras livres teve certo declínio. A comercialização de hortaliças, que a princípio, era apenas uma forma dos supermercados atraírem o consumidor acabou resultando numa mudança do hábito das pessoas onde comprar suas verduras, frutas e legumes (MACHADO, 2002).

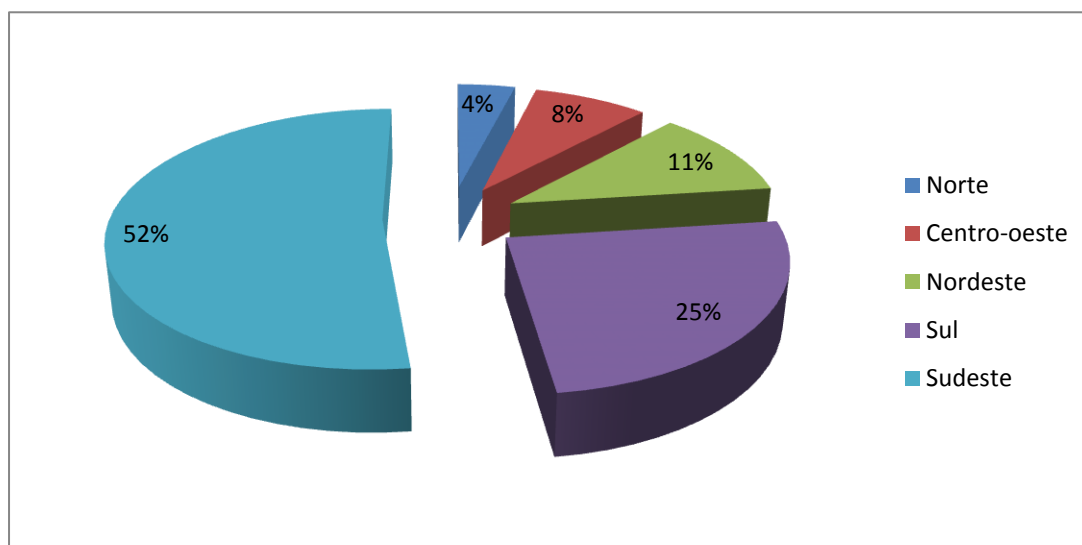
A alface está entre as 10 hortaliças mais consumidas *in natura* no Brasil, sendo bastante utilizada na confecção de sanduíches, decoração de pratos e saladas. Esta é a sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido (MAISTRO, 2001). Este vegetal é cultivado em quase todas as regiões do globo terrestre, porém apresenta-se como possuidora de uma alta perecibilidade e de baixa resistência ao transporte, sendo por isso cultivado próxima aos grandes centros consumidores (CEAGESP, 2011).

De acordo com CAETANO et al. (2001), o mercado consumidor tem a preferência por alfaces da variedade crespa, a qual possui como cultivares os tipos: Vanda, Veneza Roxa, Vera e Verônica. A alface cultivar Verônica é considerada padrão e líder de mercado, com plantas de grande porte, com folhas de coloração verde claro, semente de coloração preta e tempo de colheita entre 60 a 70 dias. A Figura 1 apresenta os cultivares de alface tipo crespa (SAKATA, 2007).



**Figura 1:** Cultivares de alfaces tipo cresa: A = cultivar Vanda; B = cultivar Veneza Roxa; C = cultivar Vera; D = cultivar Verônica.

Segundo Carlos et al. (2008) a quantidade de alface consumida diariamente é de apenas 3 a 4 folhas (30 g), quantidade inferior ao preconizado pelo Guia Alimentar para População Brasileira, elaborado pelo Ministério da Saúde, que é de 15 folhas diárias (120 g). Na Figura 2 está representado o consumo da alface nas regiões do país (IBGE, 2010).



**Figura 2:** Distribuição do consumo da alface nas diferentes regiões brasileiras

**Fonte:** Pesquisa de Orçamento Familiar (POF)-IBGE/2008-2009.

### 2.2.2 Sistemas de cultivo

O cultivo da alface é praticado nas formas tradicional ou convencional, orgânica e hidropônica. Métodos estes que, por sua vez, podem influenciar nas propriedades desta hortaliça (MIYAZAWA; KHATOUNIAN; ODENATH-PENHA, 2001). O método tradicional se caracteriza pelo cultivo da alface no solo, com uso de agrotóxicos e com uma fertilização que pode ser química, sendo que a irrigação deste cultivo costuma ser por dispersão ou por gotejamento.

A Hidroponia é um sistema de cultivo, onde a planta é cultivada em tubos plásticos, ao invés de ser no solo, por onde circula uma solução com fertilizantes químicos e nutrientes dissolvidos, acondicionados em estufas (UNLUKARA et al., 2008). Os nutrientes que a planta necessita para seu desenvolvimento e produção são fornecidos apenas por uma solução nutritiva com os elementos necessários nitrogênio, potássio, fósforo, magnésio dissolvidos na forma de sais. Basicamente, qualquer água potável para consumo humano serve para hidroponia (PAULUS et al., 2010). Neste método a hortaliça fica protegida de fatores adversos do meio ambiente como chuvas, geadas, ventos fortes e outros fatores, favorecendo a produtividade da planta (SANTANA et al., 2006). Existem diversos processos hidropônicos, porém os mais utilizados são o floating, aeroponia e NFT (Técnica do Fluxo laminar de Nutrientes).

Na hidroponia a solução nutritiva tem um controle rigoroso para manutenção de suas características. Periodicamente é realizado um monitoramento do pH e da concentração de nutrientes, subsidiando o cultivo sob as melhores condições possíveis (SOARES et al., 2010).

A agricultura orgânica surge como alternativa de produção à agricultura altamente mecanizada e rica em insumos industriais, que caracterizam o cultivo tradicional. O cultivo orgânico pode ser definido como “sistema de produção que evita, ou exclui o uso de pesticidas ou agrotóxicos, fertilizantes de composição sintética, reguladores de crescimento, ou outros agentes químicos contaminantes (PENTEADO, 2000). A sua viabilização é através de um conjunto de sistemas de produção, buscando a maximização dos benefícios sociais, a auto-sustentação, a redução/eliminação da dependência de insumos, energia não renovável e a preservação do meio ambiente através da otimização do uso de recursos naturais e sócio-econômicos disponíveis” (FEIDEN, 2001).

Basicamente, a agricultura orgânica tem como sustentáculo a aplicação no solo de resíduos orgânicos vegetais e animais, de preferência produzidos na propriedade agrícola, com o objetivo de manter o equilíbrio biológico e a ciclagem de nutrientes (FEIDEN, 2001). Segundo Espíndola et al. (2006), a agricultura orgânica tem por princípio estabelecer sistemas de produção com base em tecnologias e processos, ou seja, um conjunto de procedimentos que envolva a planta, o solo e as condições climáticas, produzindo alimento sadio, que atenda às expectativas do consumidor, com suas características e sabor originais. Outras características importantes do cultivo

orgânico são a auto-suficiência e o uso de água de boa qualidade, sem o qual não recebe esta certificação (BRASIL, 2010).

### **2.2.3 Importância na alimentação e valor nutricional**

A alface é uma importante hortaliça e compõe parcela na dieta da população brasileira, tanto pelo sabor e qualidade nutritiva quanto pelo baixo custo (COMETTI et al., 2004). Apresenta elevado teor de pró-vitamina A nas folhas verdes, alcançando até 4000 UI/100g (FILGUEIRA, 2003). Estas hortaliças são espécies ricas em sais de ferro e cálcio e apresentam quantidades razoáveis das vitaminas B1, B2, B6 e C. Possuem baixo valor em calorias, sendo aconselhável nas dietas por ser de fácil digestão (MATTOS et al., 2007).

De acordo com Franco (2007) a alface da variedade crespa apresenta a seguinte composição centesimal para 100g: proteínas (1,20 g), lipídeos (0,25 g), glicídios (2,30 g), cálcio (38 mg), fósforo (42 mg), ferro (1,10 mg), retinol (21 mcg), tiamina (87 mcg), riboflavina (187 mcg), niacina (0,324 mg) e ácido ascórbico (10 mg), tudo isto com apenas 16 calorias. Ressalta-se que as folhas externas da alface (de cor verde mais escura) contêm aproximadamente 30 vezes mais pró- vitamina A do que as internas (EMBRAPA, 2011).

Devido ao baixo valor calórico, a alface qualifica-se para diversas dietas, o que favorece grandemente o seu consumo de uma maneira geral, constituindo-se um componente imprescindível das saladas dos brasileiros (FERNANDES et al., 2002).

A alface também é utilizada na forma de suco para combater a insônia, possuindo propriedades diurética, depurativa, calmante, mineralizante, vitaminizante e desintoxicante, além de contribuir no combate às palpitações do coração e à prisão de ventre e outras desordens intestinais, devido a seu alto teor de fibras (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998). Conforme Aguilar (2002) uma dieta voltada para o consumo de legumes e verduras, entre elas a alface, possui efeito protetor no que diz respeito ao risco de se desenvolver um câncer bucal.

### 2.3 CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS

A qualidade dos vegetais, seja nutricional ou sanitária, dever ser mantida em todos os seguimentos, desde a produção até a comercialização, pois o produto deve chegar à mesa do consumidor com excelentes características organolépticas de tal forma a obter uma boa aceitação (PÔRTO, 2006).

A falta de higiene nos vegetais pode ser apontada como a causa do desenvolvimento de toxinfecções alimentares produzidas por micro-organismos nestas hortaliças (ROSA; CARVALHO, 2000). A sanitização dos mesmos, sob o ponto de vista da segurança alimentar, é considerada etapa crítica do processamento, assim como os aspectos de higiene pessoal na manipulação do produto (SAN'TANA et al, 2002). Mesmo assim, há uma falta de estudos e dados sobre a ocorrência de surtos e toxinfecções alimentares no Brasil, assim como da qualidade do alimento (REZENDE; FARINA, 2001).

Geralmente as hortaliças são consumidas cruas, e como a alface tem no processo de higienização o único tratamento recebido entre o cultivo e o consumo. Se os processos de limpeza e sanificação forem conduzidos de forma inadequada, poderá propiciar a transmissão de diversas doenças. Em 1991, o surgimento da epidemia de cólera no Brasil despertou o interesse pelo assunto, tanto pelas autoridades sanitárias quanto pela população em geral (NASCIMENTO, 2002).

Apesar de receber menos manipulação e tratamento vigoroso do que o produto ainda em plantio, após sua colheita as hortaliças recebem ainda alguns processos que podem afetar a sua segurança bacteriológica. Estas etapas de processamento envolvem necessariamente o contato humano para a imersão na água e o corte. Em tudo isso, existe o potencial para contaminar o produto com as bactérias patogênicas, assim como a possibilidade em favorecer o crescimento destes contaminantes (BALIONI, 2003).

Além dos cuidados com a higienização, os vegetais utilizados no preparo de refeições, dependendo das suas características, podem ser submetidos a processamentos preliminares, denominados genericamente de pré-preparo (ORNELLAS, 2006). Os traumatismos que os vegetais possam sofrer durante as etapas do processo de produção aumentam substancialmente a suscetibilidade ao ataque de micro-organismos e, por isso, é necessário cuidado na manipulação (SALINAS, 2002).

Todas as plantas verdes possuem uma microbiota residente, a qual subsiste com traços de carboidratos, proteínas e sais inorgânicos que estão dissolvidos

na água de exudação, ou condensados na epiderme do vegetal (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 2001).

Os micro-organismos de interesse em alimentos são encontrados em três grandes grupos: bactérias, bolores e leveduras. Certos tipos de vírus e de alguns parasitas são, também, causadores de problemas de saúde pública, sendo importantes porque podem ser veiculados através dos alimentos (ANDRADE, 2006). O ataque destes micro-organismos é causa importante nas perdas pós-colheita dos produtos perecíveis (CHITARRA; CHITARRA, 2005). As hortaliças apresentam atividade de água em torno de 0,95 ou maior, são ricos em vitaminas e sais minerais além de possuírem teores variáveis de macronutrientes o que facilita o crescimento de muitos micro-organismos (BRACKETT, 1999).

A capacidade de crescimento e/ou sobrevivência dos micro-organismos patogênicos nos alimentos dependem não só das características físicas e nutricionais dos alimentos, mas também de todo um conjunto de fatores extrínsecos e intrínsecos inerentes aos mesmos. Bactérias patogênicas e/ou suas toxinas causam a maioria dos surtos e casos notificados de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's). Praticamente todos os alimentos, de origem vegetal ou animal que não tenham sido objetos de processamento, podem veicular micro-organismos patogênicos, desde que, em algum momento, tenham sido sujeitos ao contato com material contaminante (PINTO, 2010; MASSAGUER, 2005).

A microbiota característica dos vegetais *in natura* é formada por micro-organismos provenientes do próprio solo, representada principalmente por bactérias Gram- negativas como as do gênero *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Enterobacter*, havendo também a presença de bactérias Gram- positivas como *Bacillus* spp (BRACKETT, 1994). O acesso de micro-organismos patogênicos aos vegetais se dá quando os mesmos são expostos, ainda no campo, aos riscos de fertilização com dejetos humanos e de outros animais e à irrigação com água poluída, contribuindo para a presença de agentes etiológicos de diversas enfermidades infecto-contagiosas e parasitárias que normalmente estariam ausentes (GAGLIARDI ; KARNs, 2000).

A população de micro-organismos em produtos frescos como a alface pode variar drasticamente, mas em geral é de  $10^4$ /g (BRACKETT, 1988). Fatores como o vento, chuva, animais e insetos são responsáveis por esta variabilidade (APHA, 2001).

A mais baixa temperatura de crescimento de um micro-organismo conhecida é  $-34^{\circ}\text{C}$ ; a mais alta é acima de  $100^{\circ}\text{C}$ . Costuma-se classificar os micro-

organismos em quatro grupos, conforme a sua temperatura de crescimento. Aqueles, cuja temperatura de crescimento encontra-se na faixa de 0°C a 20°C, com crescimento ótimo entre 10°C e 15°C, denominados psicrófilos. Aqueles que crescem a temperatura de 7°C ou abaixo e possuem a temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 30°C são denominados psicrotópicos. Os micro-organismos que crescem bem entre 20°C e 45°C e possuem temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 40°C são denominados mesófilos, enquanto os que crescem bem a 45°C ou mais e possuem temperatura ótima de crescimento entre 55°C e 65°C são referidos como termófilos (termoresistentes) (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005).

Devido ao fato das hortaliças apresentarem uma elevada quantidade de água e nutrientes além de um pH neutro, possuem em sua microflora o desenvolvimento preponderante de bactérias (PATEKOSKI; PIRES-ZOTTARELLI, 2009). As bactérias exercem importante papel na deterioração de hortaliças cuja microflora, quando não processada, é dominada por bactérias pectinolíticas, além de alguns bolores que conseguem elaborar as mesmas enzimas, ocasionando a deterioração dos vegetais e influenciando na sua qualidade pós-colheita. Estas enzimas possuem a capacidade de degradar celulose além de pectina provocando o amolecimento do tecido vegetal e produzindo odor desagradável e aparência úmida, sendo o gênero *Erwinia* responsável pela podridão mole bacteriana comum em várias hortaliças, a citar a alface. O gênero *Pseudomonas* causa sintomas similares aos da *Erwinia*, porém, com crescimento rápido e ocorrente em temperaturas de refrigeração. Bacilos e Clostrídios também podem crescer, no entanto, lentamente abaixo de 10°C (FRANCO; LANDGRAF, 2004). Calcula-se que 20% das frutas e hortaliças utilizadas para o consumo humano são perdidas como conseqüências de alterações microbianas (JAY, 2005).

Segundo SORIANO et al. (2001) as hortaliças podem ser contaminadas por micro-organismos patogênicos durante o cultivo, colheita, pós-colheita, processamento e distribuição. Muitos agentes patogênicos são capazes de sobreviver às operações usuais de tratamento de esgotos, vindo a contaminar os mananciais de água para irrigação e solo com material fecal, contaminando conseqüentemente os vegetais. Vários surtos infecciosos de febre tifóide, salmoneloses, shigeloses e hepatites envolvendo diversas hortaliças, entre elas a alface, podem ser creditadas a estes fatores (MAGKOS; ARVANITI; ZAMPELAS, 2003).

As hortaliças podem ser colonizadas por diversos patógenos como as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., *Shigella*

spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O 157: H7 e *Campylobacter* spp., vírus além de bolores e leveduras, possuindo condições potenciais para crescer em alface conservada em temperatura ambiente. Após permanecer no ambiente, os patógenos sobrevivem às condições de estocagem e preparo das verduras podendo causar doenças. (ROMEIRO, 2005).

Outros patógenos como o *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* (IBENYASSINE et al., 2007; LONCAREVIC; JOHANNESSEN; RORVIK, 2005), os quais causam vários problemas a saúde do homem, também já foram isolados em alfaces. Segundo Markova, Romanenko e Dukhanina (2005) o problema causado por bactérias presentes em vegetais não se restringe apenas as espécies conhecidas como patogênicas ao homem.

O risco de contrair uma infecção bacteriana quando se consome hortaliças é expressivo, pois ao contrário dos produtos de origem animal, os vegetais, especialmente os folhosos, são muitas vezes consumidos crus, sem um processamento que reduza ou elimine micro-organismos patogênicos. Além do mais, existe uma tendência de ocorrer um aumento da contaminação entre a horta e o consumidor, devido o manuseio e as condições de transporte, armazenamento e distribuição (CARRER FILHO et al., 2009).

Pesquisas mostram que uma simples lavagem com água corrente nem sempre elimina todos os coliformes presentes na superfície das folhas de alface, especialmente se a carga microbiana for elevada. Entretanto o perigo causado pelas bactérias não se limita apenas as espécies presentes na superfície das hortaliças, estudos mostram que patógenos entéricos são capazes de colonizar endofiticamente (interior dos tecidos) as plantas, o que acaba protegendo- os durante a desinfecção (BERNSTEIN et al., 2007).

Vários patógenos humanos tem se demonstrado capazes de colonizar o interior das plantas, desde as raízes e folhas até os frutos (RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006). Esta colonização faz parte do ciclo ambiental das bactérias, ciclo no qual as plantas servem de hospedeiros alternativos para a sua sobrevivência e como veículo para recolonizar hospedam animais após serem ingeridos (CARRER FILHO et al., 2009).

No ciclo ambiental, as bactérias eliminadas no solo juntamente com as fezes de animais e do homem terão que chegar as plantas para sobreviverem, para isto

contam com a ajuda dos nematóides do solo, ou da água de irrigação, ou do escoamento da pastagem de gado (KENNEY et al., 2006). Após o contato com a superfície do vegetal ocorre a internalização, processo ainda não totalmente esclarecido que ocorre mais rápido nas raízes danificadas. Uma vez penetrado nas raízes estes microorganismos poderão ser encontrados nas partes aéreas da planta após cerca de 48 horas, estando assim mais fáceis de serem ingeridos e infectarem o homem e os animais (BERNSTEIN et al., 2007).

Entre os patógenos capazes de realizar este ciclo estão a *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e a *Salmonella* sp., entretanto nem todos os sorotipos de *Salmonella* são capazes de colonizar endofiticamente as plantas (KLERKS et al., 2007).

No Brasil a falta de dados sobre toxinfecções relacionadas a produtos frescos ainda é grande e pode ser justificada pela vida curta de prateleira, pela dificuldade de contra-prova, pelo grande número de fornecedores diferentes e pela grande distribuição de produtos frescos em curto espaço de tempo, dificultando a rastreabilidade de agentes patogênicos. Apesar de não serem registradas, essas doenças não devem ser negligenciadas (BRUGALLI; PINTO; TONDO, 2000).

A resolução n° 20/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 1998) estabelece que para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de plantas frutíferas que se desenvolvem rente ao solo, as águas não devem ser poluídas com excrementos humanos.

Uma das formas de avaliar a contaminação do alimento é verificando a presença de coliformes totais e termotolerantes (GUIRALDO et al., 2004). A Resolução RDC n° 12/2001 (BRASIL, 2001), atual legislação nacional que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano, determina que para amostras indicativas de alface fresca “*in natura*”, inteira, preparada, sanificada, refrigerada ou congelada para o consumo direto (exceto cogumelo) deve ser realizada apenas a pesquisa de *Salmonella* (que deve estar ausente em 25 g da amostra). Não mais estabelecendo para amostras inteiras uma tolerância máxima para coliformes termotolerantes.

Segundo Amoah et al. (2006) a Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos recomenda um nível máximo de  $1 \times 10^3$  coliformes termotolerantes/g de vegetal fresco. As legislações nacionais anteriores a RDC n° 12/2001, a exemplo da Resolução CNNPA n° 12/ 1978 e a RDC 451/1997,

eram mais rigorosas e estabeleciam um limite máximo de coliformes termotolerantes de  $2 \times 10^2$  NMP/g, além da ausência de *Salmonella* em 25g da hortaliça.

## 2.4 CONTAMINAÇÃO POR ENTEROPARASITOS

Hortaliças mal lavadas expõem o homem a infecções tanto por helmintos como protozoários (BLUMENTHAL et al., 2004). Nas alfaces, a contaminação por enteroparasitas também é favorecido por estas apresentarem folhas largas, justapostas, flexíveis e estrutura compacta, permitindo, dessa forma, maior contato com o solo durante seu cultivo e conseqüentemente maior fixação das estruturas parasitárias, propiciando, então, maior resistência aos processos de higienização (FALAVIGNA, et al., 2005). As parasitoses intestinais constituem-se num grave problema de saúde pública, sobretudo nos países de terceiro mundo, sendo um dos principais fatores debilitantes da população, freqüentemente associadas a quadros de diarreia crônica e desnutrição (GARCIA et al., 2004).

Protozoários e helmintos são parasitas de interesse em saúde pública relacionados ao uso da água já utilizada em outros procedimentos. Uma importante característica desses organismos é a produção de um estágio de cisto ou ovo que facilitam sua sobrevivência (ERDROGUL; SENER, 2004). Fatores intrínsecos dos parasitas contribuem para a sua permanência e viabilidade nas hortaliças, conseqüentemente contribuindo para o desenvolvimento de parasitoses em indivíduos que ingere verduras cruas como a alface, entre estes fatores destacam-se a forte aderência dos ovos de helmintos às hortaliças, como ocorre com os ovos de *Ascaris* spp (FREITAS, 2004) e a elevada resistência as condições ambientais de algumas estruturas parasitárias.

Os cistos de protozoários e os ovos de helmintos sobrevivem e permanecem infectantes durante as temperaturas de verão e do inverno. Estas formas parasíticas são resistentes a desinfecção por produtos químicos, como cloro e ozônio. O potencial para transmissão de parasitoses pela disposição de resíduos na terra é ampliado, porque estas formas são extremamente resistentes e podem permanecer infectivas por longos períodos no solo (ONO et al., 2005).

Atualmente as hortaliças *in natura*, como a alface, são amplamente recomendadas como parte da alimentação diária por seu grande aporte de vitaminas, sais minerais, fibras alimentares e baixo valor calórico, sendo amplamente utilizada em dietas (LOPES, 2005). Porém, ao serem atraídos pelos benefícios oferecidos pelos vegetais, os consumidores se expõem aos riscos de infecções por enteroparasitas uma vez que se consumidas cruas podem servir como via de transmissão quando higienizadas inadequadamente (SOARES; CANTOS, 2006).

A falta de higiene pessoal no momento da manipulação dos alimentos também é um fator importante na transmissão de enteroparasitas. Indivíduos que manipulam alimentos podem também representar fonte de contaminação e disseminação, embora estejam, na maioria das vezes, na condição de portadores assintomáticos de enteroparasitas (CASTIÑEIRAS; MARTINS, 2006). Estudos realizados em algumas cidades do Brasil demonstraram elevada contaminação das alfaces comercializadas por enteroparasitas. Freitas et al. (2004) observaram que em média 57% das amostras analisadas estavam contaminadas por algum parasita, Ono et al. (2005) por sua vez detectaram que 50% das amostras ensaiadas encontravam-se contaminadas, Soares e Cantos (2006) 60%.

Parasitas comuns que ocorrem em vegetais frescos incluem *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Ascaris* spp, *Strongyloide* spp, *Ancylostomatidae*, *Taenia* spp, *Trichures trichiura* e *Enterobius vermiculares*. Esses organismos normalmente têm acesso aos vegetais antes da colheita, usualmente como resultado da água de irrigação contaminada e práticas de higiene insuficientes (ROCHA; MENDES; BARBOSA, 2008).

## 2.5 HIGIENIZAÇÃO E SANITIZAÇÃO DE HORTALIÇAS

As hortaliças, particularmente as consumidas cruas, podem servir como via de transmissão de patógenos de origem alimentar ao homem. Nesse contexto, sobressai a importância de medidas preventivas capazes de levar à erradicação desses agentes contaminantes nos alimentos, já que na maioria das vezes faltam ao consumidor

informações sobre a qualidade da hortaliça disponível comercialmente (SANTOS, 2007). O risco de toxinfecções humanas oriundas por tais vegetais pode ser reduzido prevenindo-se a contaminação dos alimentos, controlando o crescimento dos micro-organismos patogênicos, removendo-os ou diminuindo-os através das lavagens e uso de sanitizantes (BEUCHAT, 1999; SANTOS, 2007).

A higienização dos alimentos se caracteriza principalmente, pelos processos através dos quais os alimentos se tornam adequados para o consumo do ponto de vista salutar, utilizando-se várias técnicas de processamento, dentre estas os produtos de limpeza e desinfecção de alimentos (SILVA JÚNIOR, 2001; SANTOS 2007).

A lavagem dos vegetais é a prática mais utilizada para obter um produto mais seguro, no entanto, a operação de lavagem pode ser aumentada acrescentando soluções sanitizantes, objetivando a redução e ou eliminação de micro-organismos presentes nestes alimentos (BERBARI et al., 2001). A lavagem em água corrente de boa qualidade pode reduzir em até 74% a carga microbiana dos vegetais, porém, não é suficiente para manter a contaminação em níveis seguros, sendo essencial à aplicação de uma etapa de desinfecção com agentes antimicrobianos (TAKEUSHI; FRANK, 2001; SANTOS, 2007). Leitão et al. (1981), complementam que a pré-lavagem em água corrente é um requisito essencial para remoção da matéria orgânica na superfície das hortaliças, reduzindo assim a inativação dos sanitizantes químicos utilizados posteriormente na etapa da sanitização.

A desinfecção eficiente não quer dizer que necessariamente ocorra à destruição completa de todas as formas vivas como na esterilização, mas sim a redução a níveis seguros da carga microbiana presente (MEYER, 1994). A sanitização deve ser realizada por meio de procedimentos químicos ou físicos aplicados de forma adequada. A sanitização inadequada, tanto para equipamentos, alimentos e ambientes podem comprometer todo um lote de produto que não poderá ser comercializado. O processo físico de sanitização geralmente consiste na utilização de vapor, raios gama, radiação ultravioleta (UV) e ozônio, ao passo que o processo químico emprega o uso de agentes químicos como o cloro, ácidos orgânicos, agentes umectantes, quaternário de amônia e compostos iodados (BARI et al., 2003; SILVA et al., 2006; BACHELLI, 2010).

A atividade antimicrobiana dos sanitizantes depende de vários fatores, entre estes, concentração, tempo, temperatura, pH, espécie e população do micro-organismo que se pretende destruir (BEUCHAT et al., 2001). De acordo com a “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1995), um agente sanitizante

para ser considerado eficiente deve ser capaz de provocar uma redução da contagem bacteriana igual ou superior a 5 ciclos logarítmicos, ou seja, uma eliminação maior ou igual a 99,9% da população microbiana inicial.

Os produtos clorados, como os sais de hipoclorito, constituem o grupo de compostos sanitizantes mais utilizado nas indústrias de alimentos, por ser eficiente e de baixo custo. No Brasil, o hipoclorito de sódio é o único agente sanitizante permitido pela legislação e vem sendo utilizado nos produtos vegetais para manter sua qualidade microbiológica. (BERBARI et al., 2001). Os compostos à base de cloro são agentes bactericidas que reagem com as proteínas da membrana da célula microbiana, interferindo no transporte de nutrientes e promovendo a perda de componentes celulares (DYCHDALA, 2001).

Métodos de sanitização química à base de compostos clorados, especialmente os sais hipoclorito sob a forma de água clorada, tem sido amplamente utilizados na sanitização de água da rede de abastecimento e residuária, de alimentos como frutas, hortaliças, utensílios e equipamentos nas indústrias de processamento. Compostos à base de cloro são considerados de baixo custo e relativamente eficientes na ausência de excessiva matéria orgânica. Na forma de imersão ou aspersão, o hipoclorito tem sido o sanitizante mais utilizado no controle da contaminação microbiana de frutas e hortaliças, reduzindo o número de doenças relacionadas à alimentação (BEUCHAT, 1999; KIM et al., 1999; FRANCIS; O'BEIRNE, 2007).

Concentrações de 50 a 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro são geralmente, utilizadas para sanificar frutas e hortaliças frescas, porém, tratamentos inadequados com soluções de cloro podem não reduzir, efetivamente, a população de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos (BEUCHAT et al., 1998). Um importante passo para a redução da população microbiana dos vegetais consiste na lavagem dos mesmos, seguido de sua imersão em soluções antimicrobianas. A lavagem com água, contendo cloro livre, em uma concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, tem sido utilizada em folhas de alface para reduzir o número de bactérias, em até 100 vezes (FRANCIS; O'BEIRNE, 2007).

Fatores como pH, temperatura, matéria orgânica e concentração do sanificante determinam a eficiência da solução à base de cloro (DYCHDALA, 2001). A manutenção do pH da solução entre 6,5 e 7,5 é de extrema importância para o sucesso da etapa de sanificação (MORETTI, 2007). O pH próximo a 7,0 mantém o cloro na sua forma ativa de ácido hipocloroso (BEUCHAT, 1999). Considerando que o pH da água

possui impacto significativo sobre a atividade do cloro, torna-se muito importante seu ajuste na água que será utilizada junto ao sanificante.

Os produtos a base de cloro permitidos para desinfecção dos alimentos vegetais são hipoclorito de sódio a 2,0-2,5% na concentração de 100 a 250 ppm, hipoclorito de sódio a 1% na concentração de 100 a 250 ppm; e cloro orgânico na concentração de 100 a 250 ppm (SÃO PAULO, 1999). Ressalta-se que, de acordo com a Resolução RDC nº216 (BRASIL, 2004), a higienização com solução clorada somente é necessária quando os vegetais são consumidos crus.

O hipoclorito de sódio é eficaz em reduzir a população de bactérias, fungos, vírus e nematóides e, em água, origina hidróxido de sódio (NaOH) e ácido hipocloroso (HCl). O agente germicida refere-se ao ácido hipocloroso, que se dissocia em  $H^+$  e no íon  $OCl^-$  (BACHELLI, 2010). Comprovadamente, o ácido hipocloroso exerce maior ação desinfetante que o íon hipoclorito ( $OCl^-$ ), o que se explica pela maior facilidade de penetração do ácido através da parede celular, por ser uma molécula pequena e neutra (BACHELLI, 2010).

Os ácidos orgânicos de cadeia curta, embora não sejam considerados sanitizantes, têm sido muito utilizados em estudos de redução de população bacteriana em alimentos (NASCIMENTO et al., 2003). Ao longo da história, os ácidos orgânicos têm sido empregados como aditivos e preservativos alimentares, prevenindo a deterioração alimentar e prolongando a vida de prateleira de produtos perecíveis (RICKE, 2003). Nos últimos anos, o interesse da indústria alimentícia pelo uso destes compostos antimicrobianos reside no fato de estarem naturalmente presentes como constituintes de alimentos ou serem adicionados aos produtos através de formulações alimentares (NAZER et al., 2005).

De acordo com JAY (2005), Os ácidos orgânicos fracos, a exemplo dos ácidos acético, láctico, cítrico, benzóico e sórbico, fazem parte do grupo de aditivos químicos geralmente reconhecidos como seguros ou “General Recognized as Safe” (GRAS). Alguns destes ácidos têm ocorrência natural em alimentos e são comumente utilizados como preservativos em sistemas de conservação para inibir o crescimento de bactérias e fungos (FORSYTHE, 2002; NAKAI; SIEBERT, 2003). Os principais ácidos orgânicos de uso em alimentos, bem como suas faixas de concentração para inibição microbiana e Ingestão Diária Aceitável (IDA) estão descritos no Quadro 3.

A ação antimicrobiana primária e esperada dos ácidos orgânicos sobre as células dos micro-organismos fundamenta-se na relação dose-efeito com conseqüente

ocorrência de fenômenos que agem sobre o DNA, síntese protéica, atividade enzimática, membrana celular, parede celular e mecanismos de transporte de nutrientes (LÜCK; JAGER, 2002; RICKE, 2003).

Os efeitos da inibição microbiana são mais efetivos em baixos níveis de pH (< 4,5), característica esta comum à maioria dos conservantes alimentares. Nestas condições, as moléculas do ácido em seu estado não-dissociado são livremente permeáveis à membrana plasmática e capazes de penetrar no citoplasma, onde se dissociam liberando prótons (íons de hidrogênio) e ânions que se acumulam e difundem-se no interior da célula forçando-a a desviar energia (ATP) para expulsar os prótons acumulados e manter a homeostase do pH intracelular (FORSYTHE, 2002).

**Quadro 3:** Aspectos gerais de uso de alguns ácidos orgânicos com ação antimicrobiana utilizados como conservadores alimentares

| Ácidos     | Concentração em alimentos (% ou g)           | Ingestão Diária Aceitável - IDA (mg/kg)** | Alimentos empregados   |
|------------|--|---|--|
| Acético    | 0,25% - 9,0%                                 | Ilimitada                                 | Maioneses, temperos, cremes para salada, bebidas, produtos à base de carnes e vegetais |
| Láctico    | > 0,5%                                       | Ilimitada                                 | Maioneses, temperos, cremes para salada, bebidas, produtos à base de carnes e vegetais |
| Benzóico   | 0,1%<br>ou<br>*0,005 – 0,3g /<br>100g ou mL  | 0 - 5                                     | Margarina, extrato de tomate, temperos em conserva, refrigerantes, molhos              |
| Sórbico    | 0,2%<br>ou<br>*0,01 – 0,20g /<br>100g ou mL  | 0 - 25                                    | Queijos duros, molhos para salada, geléias, bolos                                      |
| Propiônico | 0,32%<br>ou<br>*0,20 – 0,40g /<br>100g ou mL | Ilimitada                                 | Produtos de panificação (pão, bolo), pickles, queijos, chocolates                      |

\*Valores máximos permitidos pela legislação brasileira

\*\*Quantidade de um aditivo medido em mg / Kg de peso corpóreo, que pode ser ingerido diariamente sem trazer complicações ao longo de toda a vida.

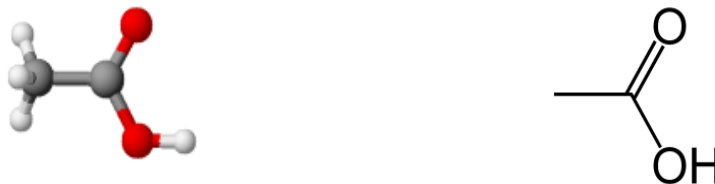
Como consequência, diversos efeitos ocorrem sobre a célula microbiana causando restrição do seu crescimento. Estes incluem: toxicidade pelo acúmulo de ânions, interferência no transporte de nutrientes (especialmente aminoácidos), danos à membrana citoplasmática resultando em extrusão e ruptura da permeabilidade da

membrana externa, influência na síntese de macromoléculas por inibição de reações metabólicas essenciais e estresse sobre a homeostase do pH intracelular (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007; RICKE, 2003). Na indústria de alimentos estes ácidos são empregados como acidulantes para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RUSSELL, 1991).

Dentre os ácidos orgânicos, o acético (Figura 3) é o mais empregado na conservação de alimentos, aromatizante natural e acidulante (SANTOS, 2007). Procedimentos como a imersão de carnes, pescados e hortaliças em soluções contendo vinagre, uma das formas de sua utilização, estão entre os métodos de conservação mais antigos já praticados (LÜCK; JAGER, 2002).

A eficácia do ácido acético como sanitizante ou antimicrobiano varia amplamente com o tipo e concentração da população bacteriana presente (BRENES, 2002). É um composto com características lipofílicas solúveis em sua forma não dissociada, o que permite sua entrada na célula, interferindo na fosforilação oxidativa, inibindo o transporte de elétrons e a produção da adenina dinucleotídeo reduzido (NADH). Esse comprometimento da atividade metabólica em combinação com a acidificação do conteúdo celular resulta na lise da célula (NASCIMENTO, 2002). A atividade antimicrobiana do ácido acético pode ser classificada em duas categorias: ação bacteriostática, inibindo o crescimento bacteriano e a ação bactericida, que seria a redução do número de células viáveis (BJORNSDOTTIR, 2005; SANTOS, 2007).

Lück; Jager (2002) referem que o emprego do ácido acético como conservante alimentar pode ocorrer na forma de vinagre (5 a 10%) ou solução aquosa sintética de 25 a 80%, tendo seu espectro de ação contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos.



**Figura 3:** Estrutura química clássica e tridimensional do ácido acético.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido e delineado no campus I da UFPB, utilizando a infra-estrutura dos laboratórios de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia dos Alimentos do Centro de Tecnologia e no de Parasitologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde.

#### 3.1 DELIAMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM

O presente estudo foi aduzido em duas etapas. Na primeira, foi realizado um estudo transversal de caráter descritivo, onde foi avaliada e investigada a qualidade higiênico-sanitária das alfaces em suas três formas de cultivo. Na segunda etapa, foi realizado um estudo experimental, com o intuito de avaliar a influência de diferentes métodos de higienização na redução da carga bacteriana de amostras de alfaces.

Os locais escolhidos para coleta das amostras de alface da variedade crespa nas formas de cultivo tradicional, orgânica e hidropônica foram 2 hipermercados de duas grandes redes, situados na cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil).

O período de análises foi de 12 meses, com início no mês de maio de 2010 e término em abril de 2011. Foram utilizadas 60 amostras de cada sistema de cultivo, sendo 30 destinadas às análises bacteriológicas e 30 para as parasitológicas, perfazendo um total de 180 espécimes. Estabeleceu-se como unidade amostral, um pé ou cabeça de alface, independentemente do seu peso ou tamanho, adotando-se como critério que cada amostra apresentasse boa qualidade e características organolépticas visuais próprias.

A coleta ocorreu no período da manhã retirando-se, aleatoriamente, uma amostra de alface fresca, *in natura*, inteira, do lote de hortaliças a venda, segundo cada sistema de cultivo. As amostras em seus respectivos invólucros foram acondicionadas individualmente em sacos de polietileno de primeiro uso, sem contato manual, devidamente identificadas e transportadas aos laboratórios para análise em bolsa térmica munida de gelo.

### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES SANITIZANTES

Uma solução na concentração de 1.0 % (v/v) foi preparada a partir de ácido acético P.A. (Reagen), em água destilada estéril, com posterior medida do seu pH. Para a solução de hipoclorito de sódio, uma solução em água destilada estéril na concentração de 150 ppm de cloro livre foi obtida a partir do produto concentrado (Focor), e o pH ajustado para 7,0. (PORTO; EIROA, 2006).

### 3.3 ENSAIOS DE HIGIENIZAÇÃO

Cada pé de alface foi desfolhado manualmente, observando uso de luvas, máscaras e toucas descartáveis durante a manipulação. Em seguida, porções de 25 g foram submetidas à higienização com água destilada estéril (250 mL) por imersão em recipiente previamente esterilizado, com auxílio de pincel também estéril. O Tratamento 1 (H1) incluiu amostras assim higienizadas; H2 amostras higienizadas e imersas em 225 mL de solução de ácido acético 1 % por 15 min, e H3 amostras higienizadas e imersas em 225 mL de solução de hipoclorito de sódio 150 ppm, por 15 min. O controle incluiu amostras sem qualquer higienização.

Os resíduos remanescentes da imersão na solução de ácido acético (H2) foram neutralizados em 225 mL de tampão fosfato pH 7,0. A neutralização dos resíduos do H3 foi conduzida pela adição de 2,0 mL de tiosulfato de sódio 10 % na mesma solução contendo o hipoclorito de sódio (PORTO; EIROA, 2006).

Feita a sanitização, as frações correspondentes aos tratamentos e controle foram individualmente homogeneizadas em liquidificador estéril, durante 2 min a 2000 rpm com 225 mL de água peptonada 0,1 %. Cada porção homogeneizada constituiu a diluição inicial ( $10^{-1}$ ) dos tratamentos, a partir da qual foram realizadas as diluições decimais sucessivas ( $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ ).

### 3.4 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Os tratamento e o controle das amostras foram submetidas à determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e pesquisa de *Salmonella* sp.

#### 3.4.1 Determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes

Na técnica do NMP foram realizados os testes presuntivo e confirmativo, utilizando três tubos por diluição. No teste presuntivo, empregaram-se tubos contendo o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), onde foram incubados a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2\text{h}$  em estufa bacteriológica. Posteriormente, fez-se o teste confirmativo por transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás no caldo LST, para tubos com caldo verde brilhante bile 2% lactose (VB) e caldo *Escherichia coli* (EC). Os tubos com caldo VB foram incubados a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2\text{h}$ , em estufa bacteriológica, enquanto que os tubos com caldo EC a  $45,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2\text{h}$ , em banho termostatizado com circulação contínua da água (Vanderzant; Splittstoesser, 2001a).

Os tubos que apresentaram crescimento com produção de gás no caldo VB foram considerados positivos para coliformes totais, e os do caldo EC, positivos para coliformes termotolerantes. A sequência de tubos positivos de cada diluição foi registrada e o cálculo de coliformes totais e termotolerantes foram determinados com auxílio da tabela de Hoskins e expressos pelo Logaritmo do Número Mais Provável por grama ( $\log_{10}$  NMP/g).

#### 3.4.2 Contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas

A contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas foi realizada empregando o sistema de semeadura por profundidade nas diluições de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ . Em cada placa adicionou-se 1 ml de cada diluição no centro das placas de petri,

para posteriormente aditar aproximadamente 20 ml de Plate Count Agar (PCA) fundido e resfriado a 46°C e depois incubadas a 35°C por 24-48h. Após incubação, foram utilizadas as placas que apresentaram colônias entre 25-250 Unidades Formadora de Colônia por grama (UFC/g) para quantificação (OLIVEIRA et al., 2010). Os resultados foram expressos pelo Logaritmo de Unidade Formadora de Colônia por grama ( $\log_{10}$  UFC/g) de hortaliça.

### 3.4.3 Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para a pesquisa de *Salmonella* sp. o preparo e sanitização das amostras foi similar ao descrito em 3.6, onde decorrido esta etapa transferiu-se as 25 gramas para frascos contendo 225 mL de caldo lactosado (pré-enriquecimento), que foi incubado a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $18 \pm 2\text{h}$ . Posteriormente, a partir da amostra pré-enriquecida, foram transferidas alíquotas de 0,1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport - Vassiliadis (1:100) e 1 mL para os de caldo Tetracionato e Verde Brilhante (1:10), os quais foram incubados a  $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{h}$  em banho termostatzado (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 2001b). Decorrido este período, realizou-se o plaqueamento diferencial utilizando os Agares Hectoen Enteric e o Salmonella-Shigella pela técnica de esgotamento por estrias sucessivas, com posterior incubação a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24h. Transcorrido este espaço de tempo, selecionou-se duas colônias com características de *Salmonella* (lactose negativas e produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$ ) para serem submetidas à triagem bioquímica com provas de crescimento em Citrato de Simmons, motilidade e produção de indol em meio Sulfito Indol Motilidade, produção de  $\text{H}_2\text{S}$  e gás em ágar tríplice açúcar ferro; descarboxilação da lisina e hidrólise da uréia (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 2001b).

## 3.5 ANÁLISE PARASITOLÓGICA

A análise parasitológica das hortaliças foi realizada conforme descrito por Takayanagui et al. (2007). As partes deterioradas foram desprezadas e as amostras

submetidas ao desfolhamento tendo cada folha abluída com pincel n° 16 em um refratário estéril de vidro, contendo 250 mL de água destilada estéril. Ao final desta etapa, a água foi filtrada em gaze de 8 dobras e recolhida em cálices de fundo cônico, a fim de ser repousada por 24 h, para exame de sedimentação espontânea (BAILENGER, 1962). Decorrido este período, cada cálice foi examinado de forma independente, sendo 0,1 mL do sedimento obtido analisado em microscópio óptico, em aumento de 10x e 40x, após ser acrescentado lugol sobre a lâmina.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média dos três ensaios paralelos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste t de Student e teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico utilizou-se o software Sigma Stat. 3.5.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ARTIGO

\*Escrito segundo normas da revista:

#### **Food Control**

#### **Microbiological quality of lettuce (*Lactuca sativa*) from different production systems**

Qualidade microbiológica de alface (*Lactuca sativa*) obtida em diferentes sistemas de cultivo

Nelson Justino Gomes Neto <sup>a</sup>, Renata Maynart Lucena Pessoa <sup>a</sup>, Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga <sup>a</sup>, Marciane Magnani <sup>b</sup>, Francisca Inês de Sousa Freitas <sup>c</sup>, Evandro Leite de Souza <sup>d</sup> Janeeyre Ferreira Maciel <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

<sup>d</sup> Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

#### **Abstract**

This study aimed to evaluate the microbiological quality of 180 lettuce samples (*Lactuca sativa*) iceberg variety from different cropping systems and to verify the effectiveness of two sanitizers in reducing bacterial load. *Salmonella* sp. was not detected in any of the samples analyzed, regardless of the cropping system. The results showed high contamination by mesophilic aerobic bacteria in traditionally grown and

organic samples, which also showed thermotolerant coliforms above levels recommended by law in 66% and 80% of samples, respectively. Traditionally grown and organic samples also showed a high frequency of intestinal parasites, including pathogenic species *Taenia* sp. and *Entamoeba histolytica*. In contrast, only 20% of hydroponically grown lettuce samples were contaminated with parasites and showed counts of thermotolerant coliform bacteria below limits established by law. Sodium hypochlorite and acetic acid at concentrations 100 mg L<sup>-1</sup> and 1%, respectively, were effective, reducing bacterial counts, even in samples with high contamination levels.

**Keywords:** Lettuce; Sanitizers; Cropping systems.

## 1. Introduction

The consumption of leafy green vegetables provides numerous health benefits, showing direct relationship with the reduction of chronic diseases like hypertension, diabetes, atherosclerosis and cancer (López-Galvéz et al., 2010). In Brazil, among leafy vegetables, lettuce iceberg variety is the most consumed (*Lactuca sativa*), which represents about 40% of the total volume traded in central supply companies (Oliveira et al., 2010). This vegetable is a source of fibers, minerals and vitamins A, B1, B2, B6 and C; has laxative, diuretic and lenitive properties and a pleasant and refreshing taste (Keskinen, Burke & Annous, 2009). However, since leafy green vegetables are frequently consumed raw, it may involve the transmission of pathogenic microorganisms and/or their toxins, being a vehicle for foodborne illness (DTAS) caused by bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*) (Magkos, Arvaniti & Zampelas, 2003), or by intestinal parasites (*Giardia lamblia*, *Taenia* sp., *Entamoeba histolytica*, *Strongyloides stercoralis*) (Daryani et al., 2008). Thus, a proper and standardized

sanitizing process is essential for its consumption not to bring risks to consumers (Lee, Costello & Kang, 2004).

The cultivation of lettuce is performed through traditional, organic and hydroponic systems. The traditional method is characterized by the cultivation of lettuce in the soil with the use of fertilizer and pesticide, mostly of chemical nature. The hydroponic method is characterized by the cultivation of plants in plastic tubes containing a solution with dissolved nutrients and chemical fertilizers. In this system, the vegetable remains protected from adverse environmental factors such as rain, frost and strong winds, which favors its productivity (Chaves et al., 2000). Organic agriculture has emerged as an alternative to highly mechanized agriculture rich in industrial inputs, characterized as a production system that avoids or excludes the use of pesticides, agrochemicals, synthetic fertilizers, growth regulators or other chemical contaminants (Lopes et al. 2004; Guadagnini, Rath & Reyes, 2005).

Previous studies have shown microbiological quality problems in leafy green vegetables, including lettuce, due to contamination by thermotolerant fecal coliforms and intestinal parasites, especially in traditional and organic systems (Niemira, 2007). Poor sanitary conditions in rural and urban areas favor the transmission of these pathogens, which occurs primarily through irrigation water and fertilizers contaminated by animal and / or human fecal waste (Amoah et al., 2007).

Washing and sanitizing before consumption, regardless of cropping system, is the only measure taken to reduce the risk of contamination by vegetables like lettuce (Trinette, Morgan & Linton, 2010). Chlorine is the active ingredient commonly used in the form of sodium hypochlorite (Fukumoto, Toivonem & Delaquis, 2002). Another widely used sanitizing agent is acetic acid, often used in the form of vinegar in various dilutions (Lück & Jager, 2002).

In this context, knowing the pathogenic microorganisms present in lettuce from different cropping systems provides important data on the hygienic conditions regarding production, storage, shipping and handling and can provide information for the decision making to control the hygienic and sanitary conditions of the production system (Johannessen et al., 2004). However, data are scarce in literature and there is little comparative information on the contamination levels of lettuce from traditional, organic and hydroponic systems of the same region (Lopes et al., 2004).

The aim of this study was to perform a microbiological evaluation of lettuce samples iceberg variety from different cropping systems and verify the efficiency of acetic acid and sodium hypochlorite to reduce bacterial counts.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Sampling**

Lettuce samples, iceberg variety, from traditional, organic and hydroponic cropping systems were purchased in two hypermarkets in the city of Joao Pessoa, Brazil. Samples were collected from May 2010 to April 2011, on a weekly basis. The sampling unit established was a head of lettuce, regardless of weight or size, 60 samples per cropping systems, 30 of these were used for bacteriological analyses and 30 for parasitological analyses, in a total of 180 specimens. The samples were properly identified and individually wrapped in polythene bags, without manual contact, and transported to the laboratory in thermal bags.

### **2.2. Preparation of the sanitizing solutions**

A solution at concentration of 1% (Reagen, Rio de Janeiro) containing acetic acid in sterile distilled water was prepared with subsequent pH measurement. For the

sodium hypochlorite solution (Gota química, São Paulo), a solution in sterile distilled water at concentration of  $150 \text{ mg L}^{-1}$  of free chlorine was obtained from the concentrated product and the pH was adjusted to 7.0 (Porto & Eiroa, 2006).

### 2.3. Sanitizing tests of lettuce samples

Each head of lettuce was manually defoliated using disposable gloves, masks and caps during handling. Then, 25 g portions were submitted to washing with sterile distilled water (250 mL) by immersion in previously sterilized container, with the help of sterile brush. Sanitizing Treatment 1 (H1) included samples submitted to washing only; H2 included samples washed and immersed in 225 mL of 1% acetic acid for 15 min, and H3 included samples washed and immersed in 225 mL of sodium hypochlorite at  $150 \text{ mg L}^{-1}$  for 15 min. Control included samples without any type of sanitizing treatment.

The waste remaining from immersion in acetic acid (H2) was neutralized in 225 mL of phosphate buffer (pH 7.0). 2 mL of 10% sodium thiosulfate were added to the sodium hypochlorite solution for neutralization of residues in samples submitted to procedure H3 (Porto & Eiroa, 2006).

After the sanitization process, the fractions corresponding to the different treatments were individually homogenized in sterile blender for 2 min at 2000 rpm with 225 mL of 0.1% peptone water. Each homogenized portion was the initial dilution ( $10^{-1}$ ) of treatments, from which, successive decimal dilutions were performed ( $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ ).

#### 2.4. Bacteriological analysis

In samples submitted to different sanitizing treatments, the most probable number (MPN) of total and thermotolerant coliforms was determined, as well as total count of mesophilic aerobic microorganisms and *Salmonella sp.*

In the MPN technique, presumptive and confirmatory tests were performed using three tubes per dilution. In the presumptive test, tubes containing Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST) were used, which were incubated at 35°C for 48 h in bacteriological incubator. Later, confirmatory test was performed by transferring tubes with gas production in LST broth to tubes with brilliant green bile broth 2% lactose (BG) and *Escherichia coli* broth (EC). BG broth tubes were incubated at 35°C for 48 h in bacteriological incubator, while the EC broth tubes were incubated at 45°C for 24 h in a thermoregulated bath with continuous water circulation. Tubes showing growth with gas production in BG broth were considered positive for total coliforms, and those of EC broth were positive for fecal coliforms. The sequence of positive tubes for each dilution was recorded and the MPN calculation of total and thermotolerant coliforms was determined with the aid of Hoskins table (Vanderzant; Splittstoesser 2001a).

For determination of mesophilic aerobic microorganisms, the Plate Count Agar was used (PCA) with incubation at 35°C for 24-48 h. The results were expressed by the Logarithm of Colony Forming Units per gram ( $\log_{10}$  CFU / g) of vegetables (Oliveira et al., 2010).

For the search of *Salmonella sp.*, pre-enrichment was performed in Lactose broth at 35°C for 18 h with subsequent enrichment in selective medium composed of Tetrathionate broth with Brilliant Green (1:10) and Rappaport - Vassiliadis (1:100) with incubation at water bath for 24 h at 42°C. The differential plating was conducted in Hectoen Enteric Agar and Salmonella-Shigella Agar and incubated at 35°C for 24 h.

Characteristic *Salmonella* colonies (lactose negative and H<sub>2</sub>S production) were submitted to biochemical screening with evidence of growth in Simmons Citrate, motility and indole production in sulfide-indole-motility medium, H<sub>2</sub>S and gas production in triple sugar iron agar, lysine decarboxylation and urea hydrolysis (Vanderzant; Splittstoesser, 2001b).

## 2.5. Parasitological analysis

The parasitological analysis of vegetables was performed as described by Takayanagui et al. (2007). The damaged parts were discarded and samples were submitted to defoliation, where each leaf was washed with brush size 16 in a sterile glass container containing 250 ml of sterile distilled water. At the end of this stage, the water was filtered through eight-fold gauze and collected in conical bottom cups and left to rest for 24 h for spontaneous sedimentation examination (Bailenger, 1962). After this period, each cup was examined independently, and 0.1 mL of the sediment obtained was analyzed in optical microscope at 10x and 40x magnification, after adding lugol on the slide.

## 2.6. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate and the results expressed as the mean of three trials. Statistical analysis was performed using the Student t test and Tukey's test to determine significant differences between means, considering  $p < 0.05$ . The statistical analyses were carried out using the Sigma Stat. 3.5 software.

### 3. Results and discussion

The average values for mesophilic aerobic bacteria in lettuce samples grown in traditional, organic and hydroponic systems ranged from 6.48 to 8.08  $\log_{10}$  CFU/g, 6.85 to 8.30  $\log_{10}$  CFU/g and 4.35 to 6.24  $\log_{10}$  CFU/g, respectively (Table 1).

**Table 1**

Counting range of microorganisms found in samples of lettuce under different cropping systems, sold in the city of João Pessoa (Brazil)

| Cropping systems | Mesophilic ( $\log_{10}$ CFU/g) | Total Coliforms ( $\log_{10}$ MPN/g) | Thermotolerant Coliforms ( $\log_{10}$ MPN/g) |
|------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| Traditional      | 6,48 – 8,08                     | 2,32 – > 3,38                        | 1,36 – 2,66                                   |
| Organic          | 6,85 – 8,30                     | 2,66 – > 3,38                        | 1,63 – 2,66                                   |
| Hydroponic       | 4,35 – 6,24                     | 1,63 – 2,38                          | 0,95 – 1,63                                   |

Presented as mean values of three replicates for each sample. Different medium in the differ by Tukey's test, considering ( $p \leq 0,05$ ).

The Brazilian legislation has no maximum acceptable levels established for mesophilic aerobic microorganisms in vegetables consumed raw; however, Solberg et al. (1990) reported that values greater than 5.0  $\log_{10}$  CFU/g indicate improper food, since most pathogenic bacteria are mesophilic. In the present study, all samples from traditional and organic cropping systems showed counts greater than 5.0  $\log_{10}$  CFU/g, while in the hydroponic system, only 20% ( $n=6$ ) had counts above this value. The average values observed for mesophilic aerobic microorganisms in the traditionally grown samples (6.48  $\log_{10}$  CFU/g) differ from those reported by Soriano et al. (2000), who found counts of 6.95  $\log_{10}$  CFU/g. For the organic system, the average count (7.56  $\log_{10}$  CFU/g) was similar to results obtained by Wießner et al. (2009) for lettuce grown in an organic cropping system in Germany. In turn, hydroponically grown samples

showed an average mesophilic aerobic bacteria count ( $5.10 \log_{10}$  CFU/g) higher than that found by Favaro-Trindade et al. (2007).

In samples from the three cropping systems analyzed in this study, the presence of *Salmonella* sp was not detected. The absence of this pathogen in lettuce grown in traditional and organic systems was also reported in previous studies (Oliveira et al., 2010, Oliveira et al., 2011). These results are in agreement with the RDC Resolution No 12/2001 (Brasil, 2001), which establishes the absence of *Salmonella* sp in 25 g of fresh vegetables.

Total and thermotolerant coliforms were found in all lettuce samples analyzed; however samples grown in the traditional and organic cropping systems had higher counts than those obtained through the hydroponic system (Table 1). The presence of coliforms in vegetables indicates negligence on cultivation and/or production, which can lead to unsatisfactory hygienic conditions (Wießner et al., 2009, Soriano et al., 2000). Although the counts of total coliforms were high (Table 1), their presence in water and food has less impact compared to thermotolerant coliforms or *E. coli*, and there is no standard in the Brazilian legislation proposing limit counts for vegetables. Values considerably higher than those found in this study for total coliforms in lettuce have already been reported (Amoah et al., 2006).

On the other hand, for thermotolerant coliform bacteria, the maximum limit established by Brazilian legislation is  $2.0 \log_{10}$  MPN / g (Brasil, 2001). Based on this standard, among the lettuce samples grown in traditional and organic cropping systems, 66% (n=20) and 80% (n = 24), respectively, showed counts above the recommended limit, while all hydroponically grown samples had counts below this limit. These data confirm previous reports that the contamination with thermotolerant coliform bacteria is higher in vegetables grown in the traditional system when compared to organic and

hydroponic cropping systems (Lee, Costello & Kang, 2004; Park et al., 2008). Presumably, this difference is related to the soil contact, which is characterized as an important source of microbial contamination in traditional and organic cropping systems. Moreover, the practice of irrigation with untreated water and application of manure as fertilizer, especially in the organic system can contribute to a higher contamination level.

Considering the effect of different types of washing and sanitizing procedures on the counts of mesophilic aerobic bacteria in lettuce from the different cropping systems, it was observed that the use of sodium hypochlorite ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ) was more effective, reducing to  $5.38 \log_{10} \text{ CFU/g}$ ,  $5.55 \log_{10} \text{ CFU/g}$  and  $3.53 \log_{10} \text{ CFU/g}$  the counts of traditional, organic and hydroponic lettuce, respectively (Table 2). These results are higher than those previously reported by Soriano et al. (2000), who found reduction of  $2.37 \log_{10} \text{ CFU/g}$  in the counts of lettuce leaves treated with sodium hypochlorite at  $150 \text{ mg L}^{-1}$ . Porto & Eiroa (2006) reported that sodium hypochlorite at  $100 \text{ mg L}^{-1}$  was able to reduce *L. monocytogenes* by  $1.9 \log_{10} \text{ CFU/g}$  in experimentally inoculated lettuce.

**Table 2**

Effect of cleaning and sanitizing treatments on the count of mesophilic aerobic bacteria in lettuces obtained from different cropping systems

| Treatments | Traditional<br>( $\log_{10} \text{ CFU/g}$ ) | Organic<br>( $\log_{10} \text{ CFU/g}$ ) | Hydroponic<br>( $\log_{10} \text{ CFU/g}$ ) |
|------------|--|--|---|
| Control    | 7,21 ( $\pm 0,49$ ) <sup>a</sup>             | 7,56 ( $\pm 0,57$ ) <sup>a</sup>         | 5,10 ( $\pm 0,56$ ) <sup>a</sup>            |
| H1         | 6,41 ( $\pm 0,33$ ) <sup>b</sup>             | 6,78 ( $\pm 0,59$ ) <sup>b</sup>         | 4,17 ( $\pm 0,49$ ) <sup>b</sup>            |
| H2         | 2,33 ( $\pm 0,52$ ) <sup>c</sup>             | 2,93 ( $\pm 0, 58$ ) <sup>c</sup>        | 1,88 ( $\pm 0,46$ ) <sup>c</sup>            |
| H3         | 1,83 ( $\pm 0,47$ ) <sup>c</sup>             | 2,01 ( $\pm 0,36$ ) <sup>c</sup>         | 1,57 ( $\pm 0,44$ ) <sup>c</sup>            |

Values presented as mean and standard deviation. Different letters in the same column showed difference by Tukey's test,  $p \leq 0.05$ . H1: samples cleaned with sterile distilled water, H2: samples cleaned and treated with acetic acid, H3: samples cleaned and treated with sodium hypochlorite.

The application of acetic acid (1.5%) caused reduction in the counts of mesophilic aerobic bacteria of 4.88 log<sub>10</sub> CFU/g, 4.63 log<sub>10</sub> CFU/g and 3.22 log<sub>10</sub> CFU/g in samples of lettuce grown in traditional, organic and hydroponic systems, respectively. Porto & Eiroa (1996) used vinegar at 6%, which corresponds to 0.25% acetic acid for the sanitation of lettuce grown in the traditional system and found reductions below 1 log<sub>10</sub> CFU/g. Entani et al. (1998) used acetic acid at concentration ten times higher (2.5%) and found reductions of up to 8 log<sub>10</sub> CFU/g in the population of *E. coli* O157: H7 in traditionally grown lettuce.

As expected, the use of washing with distilled water (H1) showed lower efficiency, reducing on average 0.80 log<sub>10</sub> CFU/g in the traditional system, 0.78 log<sub>10</sub> CFU/g in the organic system and 0.93 log<sub>10</sub> CFU/g in the hydroponic system. According to Berbari, Pascholiano & Silveira (2001), washing with water causes a reduction of microbial load, probably of soil microorganisms, but this reduction is not satisfactory, requiring the addition of sanitizing solutions.

The application of acetic acid (H2) and sodium hypochlorite (H3) in lettuce samples resulted in products with counts of thermotolerant coliform bacteria within limits recommended by Brazilian legislation (<2 log<sub>10</sub> MPN/g), regardless of the cropping system (Table 3). These results agree with previous reports on reductions in the number of thermotolerant coliform bacteria in lettuce by the use of sodium hypochlorite at 150 mg L<sup>-1</sup> (Soriano et al. 2000; Odumeru et al., 2003, Parish et al., 2003) and 1% acetic acid (Pirovani et al., 1998).

The parasitological analysis of lettuce samples revealed the occurrence of intestinal parasites in all samples from traditional and organic systems, and 20% of samples from the hydroponic system (Table 4). These samples are considered of poor quality, according to the RDC Resolution No 12 / 1978 (Brasil, 1978), which proposes

the absence of dirt, parasites and worms. This reinforces the occurrence of contamination, especially in samples from the organic cropping system detected in bacteriological analyses.

**Table 3**

Effect of cleaning and sanitizing treatments on enumeration ( $\log_{10}$  MPN/g) of Total Coliforms (TC) and thermotolerant (TTC) in lettuces grown in different cropping systems

| Treatments | Traditional         |                     | Organic             |                     | Hydroponic          |        |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|
|            | TC                  | TTC                 | TC                  | TTC                 | TC                  | TTC    |
| Control    | > 3,38 <sup>a</sup> | 2,38 <sup>a</sup>   | > 3,38 <sup>a</sup> | 2,51 <sup>a</sup>   | 1,83 <sup>a</sup>   | 0,95   |
| H1         | 2,66 <sup>a</sup>   | 1,63 <sup>a</sup>   | 3,04 <sup>a</sup>   | 1,97 <sup>a</sup>   | 0,95 <sup>a</sup>   | < 0,48 |
| H2         | 1,36 <sup>b</sup>   | < 0,48 <sup>b</sup> | 1,36 <sup>b</sup>   | 0,95 <sup>a</sup>   | < 0,48 <sup>a</sup> | < 0,48 |
| H3         | 1,36 <sup>b</sup>   | < 0,48 <sup>b</sup> | 1,20 <sup>b</sup>   | < 0,48 <sup>b</sup> | < 0,48 <sup>a</sup> | < 0,48 |

Values presented as mean and standard deviation. Different letters in the same column showed difference by Tukey's test,  $p \leq 0.05$ . H1: samples cleaned with sterile distilled water, H2: samples cleaned and treated with acetic acid, H3: samples cleaned and treated with sodium hypochlorite.

*Entamoeba coli* and *Endolimax nana* were the most prevalent protozoa in samples from the three cropping systems analyzed. Although not pathogenic, both parasites are indicators of fecal contamination of human and / or animal origin in vegetables (Slifko, Smith & Rose, 2000). These findings are similar to those obtained by Robertson & Gjerde (2001) for lettuce samples from traditional and hydroponic cropping systems. The helminth found in lettuce samples from all cropping systems was *Strongyloides stercoralis* (Table 4). According to Ingham et al. (2004) the importance of its detection is related to clinical manifestations caused in immunodepressed hosts such as bleeding, swelling and intestinal ulceration.

**Table 4**

Frequency of intestinal parasites in samples of lettuce, curly variety, according to different cropping systems, marketed in the city of João Pessoa (Brazil)

| Parasitic forms                  | Traditional |      | Organic |      | Hydroponic |      |
|----------------------------------|-------------|------|---------|------|------------|------|
|                                  | N           | %    | N       | %    | N          | %    |
| <i>Endolimax nana</i>            | 15          | 50   | 18      | 60   | 3          | 10   |
| <i>Entamoeba coli</i>            | 21          | 70   | 23      | 76,7 | 4          | 13,3 |
| <i>Entamoeba histolytica</i>     | 10          | 33,3 | 15      | 50   | 3          | 10   |
| <i>Giardia lamblia</i>           | -           | -    | 5       | 16,7 | -          | -    |
| <i>Iodamoeba butschlii</i>       | 3           | 10   | -       | -    | -          | -    |
| <i>Ancylostomatidae</i>          | -           | -    | 3       | 10   | -          | -    |
| <i>Ascaris lumbricoides</i>      | 3           | 10   | 6       | 20   | -          | -    |
| <i>Strongyloides stercoralis</i> | 18          | 60   | 21      | 70   | 1          | 3,3  |
| <i>Taenia</i> sp                 | 2           | 6,7  | 3,3     | 5    | -          | -    |
| <i>Trichostrongylus</i> sp       | -           | -    | 3       | 10   | -          | -    |

*Entamoeba histolytica* cysts were detected in lettuce samples from the three cropping systems studied, which is the parasitic agent responsible for amebiasis, a major cause of death by parasitic diseases worldwide (Erdogrul & Sener, 2005). The identification of *Taenia* sp eggs in lettuce samples from traditional and organic cropping systems is also important, since this agent can cause neurocysticercosis, considered the most severe pathogenesis caused by helminths (Slifko, Smith & Rose, 2000). Although the results of parasitological analyses obtained in this study agree with data from previous studies, variations in the frequency of intestinal parasites and species detected in vegetables may be related not only to the type of cropping system, but also with the methodology used in the parasitological examination (Baré et al. , 2009; Kozan et al., 2005). Although the relevance of the contamination in vegetables by enteric protozoa and helminths is recognized, previous studies reporting contamination levels in fresh lettuce for consumption in its different cropping systems are still scarce.

#### 4. Conclusion

Lettuce samples from traditional and organic cropping systems showed poor hygiene and sanitary quality, evidenced by the high contamination by mesophilic aerobic bacteria and total and thermotolerant coliforms. These systems also present contamination by intestinal parasites, including *Entamoeba histolytica* cysts and of *Ascaris lumbricoides* and *Taenia* sp eggs. In general, samples from the organic system were the most contaminated both by bacteria and intestinal parasites. On the other hand, the lowest contamination level was observed in hydroponically grown lettuce. The results showed that washing with sterile water was sufficient to reduce the bacterial load to safe levels for human consumption in hydroponically grown lettuce, but not sufficient for samples from traditional and organic systems. Sodium hypochlorite at 150 mg L<sup>-1</sup> and 1% acetic acid showed an effective sanitizing effect for reducing bacterial contamination of lettuce samples from the three cropping systems tested. Given that lettuce is usually consumed in the fresh form, these results suggest that the use of acetic acid and sodium hypochlorite for sanitation is an effective alternative for reducing microbial contamination.

#### 5. References

- Amoah, P., Drechsel, P., Abaidoo, R. C., & Ntow, W. J. (2006). Pesticide and pathogen contamination of vegetables in Ghana's urban markets. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 1-6.
- Amoah, P., Drechsel, P., Abaidoo, R. C., & Klutse, A. (2007). Effectiveness of common and improved sanitary washing methods in selected cities of West Africa for the reduction of coliform bacteria and helminth eggs on vegetables. *Tropical Medicine and International Health*, 12, 40-50.

Bailenger, J. (1962). Valuer compare des ethodes d'enrichissement en coprologie prarasitaire. *Pharmaceutical Biology*, 3, 249-259.

Baré, J., Sabbe, K., Van Wichelen, J., Van Gremberghe, I., D'hondt, S., & Houf, K. (2009). Diversity and habitat specificity of free-living protozoa in commercial poultry houses. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1417-1426.

Berbari, S. A. G., Pascholiano, J. E., & Silveira, N. F. A. (2001) Effect of chlorine in the washing water for disinfection of minimally processed lettuce. *Food Science and Technology*, 21, 197-201.

Brasil, Anvisa. Resolução RDC nº 12 de 24 de Julho de 1978. Aprova Normas Técnicas Especiais relativa a alimentos e bebidas. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 42-49.

Brasil, Anvisa. Resolução RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Estabelece Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil*, 45-53.

Chaves, P.A., Laird, L.M., Sutherland, R., & Beltrao, J. (2000). Assessment of fish culture water improvement through the integration of hydroponically grown lettuce. *Water Science and Technology*, 42, 43–47.

Daryani, A., Ettehad, G. H., Sharif, M., Ghorbani, L., & Ziaei, H. (2008). Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. *Food Control*, 19, 790-794.

Eiroa, M. N. U., & Porto, E. (1996). Influence of different types of vinegar and sodium hypochlorite on the survival of *Vibrio cholerae* in artificially contaminated lettuce leaves (*Lactuca sativa*). *Food Science and Technology*, 26, 199-207.

Entani, E., Mito, A., Shigetomo, T., Yoshimori, T., & Michio, O. (1998). Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 61, 953-959.

Erdogrul, O. R., & Sener, H. (2005). The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolytica* cysts and *Giardia lamblia* cysts. *Food Control*, 16, 557-560.

Favaro-Trindade, C. S., Martello, L. S., Marcatti, B.; Moretti, T. S., Petrus, R. R., Almeida, E., & Ferraz, J. B. (2007). Effect of the organic, hidroponic, and conventional cultivation systems on smooth lettuce quality. *Brazilian Journal Food and Technology*, 10, 111-115.

Fukumoto, L. R., Toivonen, P. M. A., & Delaquis, P. J. (2002). Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic vascular tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4503-4511.

Guadagnin, S. G., Rath, S., & Reyes, F. G. R. (2005). Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. *Food Additives and Contaminants*, 22, 1203-1208.

Ingham, S. C., Losinski, J. A., Andrews, M. P., Breuer, J. E., Breuer, J. R., & Wood, T. M. (2004). Escherichia coli contamination of vegetables grown in soil fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6420-6427.

Johannessen, G. S., Frøseth, R. B., Solemdal, L., Jarp, J., Wasteson, Y., & Rørvik, L. M. (2004). Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic Iceberg lettuce. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 787-794.

Keskinen, L. A., Burke, A., & Annous, B. A. (2009). Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate Escherichia coli O157:H7 from lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 134-140.

Kozan, E., Gonenc, B., Sarimehmetoglu, & O., Aycicek, H. (2005). Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food Control*, 16, 239-242.

Lee, S. Y., Costello, & M., Kang, D. H. (2004). Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer of lettuce leaves. *Journal of Food Protection*, 67, 1371–1376.

Lopes, S.J., Dourado Neto, D., Manfron, P.A., & Jasniewicz, L.R., (2004). Models to estimate phytomass accumulation of hydroponic lettuce. *Scientia Agricola*, 61, 392–400.

Lopéz-Galvéz, F., Allende, A., Truchado, P.,Martinez-Sánchez, A., Tudela, J. A., % Selma,M. V. (2010). Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodiumhypochlorite as na effective sanitizer forpreservingquality of fresh-cut lettucewhile avoiding by-product formation. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 53–60.

Lück, E., & Jager, M. (2002). Conservación química de los alimentos: características, uso, efectos. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 2002.

Magkos, F.; Arvaniti, F.; & Zampelas, A. (2003). Organic food: Nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal Food Science and Nutrition*, 54, 357-371.

Niemira, B. A. (2007). Relative efficacy of sodium hypochlorite wash versus irradiation to inactivate Escherichia coli O157:H7 internalized in leaves of romaine lettuce and baby spinach. *Journal of Food Protection*, 70, 2526–2532.

Odumeru, J. A., Boulter, J., Knight, K., Lu, X., & McKellar, R. (2003). Assessment of a thermal–chemical process to extend the shelf life of ready-to-use lettuce. *Journal of Food Quality*, 26, 197-209.

Oliveira, M., Usall, J. Viñas, I., Anguerra, M., Gatiús, F., & Abadias, M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27, 679-684.

Oliveira, M. A., Souza, V. M., Bergamini, A. M. M., & Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil, *Food Control*, 22, 1400-1403.

Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N., & Busta, F. F. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 161-173.

Park, E.-J., Alexander, E., Taylor, G.A., Costa, R., & Kang, D. H. (2008). Effect of electrolyzed water for reduction of foodborne pathogens on lettuce and spinach. *Journal of Food Science*, 73, 268-272.

Pirovani, M. E., Piagentini, A. M., Gomes, D. R., & Dipentima, J. H. (1998). Quality of minimally processed lettuce as influenced by packaging and chemical treatment. *Journal of Food Quality*, 22, 475-484.

Porto, E., & Eiroa, M. N. U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Vegetables. (2006). *Food and Environmental Sanitation*, 21, 282-286.

Robertson, L. J., & Gjerde, B. (2001). Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection*, 64, 793-98.

Slifko, T. R., Smith, H. V., & Rose, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 30, 1379-1393.

Solberg, M., Buckalew, J. J., Cheu, C. M., Schaffer, D.W., O'Neill, K., McDowell, J., Post, L.S., & Boderck, M., (1990). Microbiological safety assurance system for foodservice facilities. *Food Technol*, 12, 68-73.

Soriano, J. M., Ricob, H., Moltó, J. C. J., & Mañes, J. (2000). Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 123-128.

Takayanagui, O. M., Capuano, D. M., Oliveira, C. A. D., Bergamini, A. M. M., Okino, M. H. T., Castro e Silva, A. A. M. C., Oliveira, M. A., Ribeiro, E. G. A., & Takayanagui, A. M. M. (2007). Evaluation of the contamination of lettuce crops after the establishment of the monitoring system in Ribeirão Preto, SP. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 40, 239-241.

Trinetta, V., Morgan, M. T., & Linton, R. H. (2010). Use of high-concentration-short-time chlorine dioxide gas treatments for the inactivation of *Salmonella enterica* spp. inoculated onto Roma tomatoes. *Food Microbiology*, 27, 1009-1015.

Vanderzant, C., & Splittoesser, D. F. (2001a). *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. in: APHA/TCMMF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington.

Vanderzant, C.; & Splittoesser, D. F. (2001b). *Salmonella*. in: APHA/TCMMF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington.

Wießner, S., Thiel, B., Krämer, J., & Köpke, U. (2009). Hygienic quality of head lettuce: Effects of organic and mineral fertilizers. *Food Control*, 20, 881–886.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de alface oriundas dos cultivos tradicional e orgânico apresentaram baixo padrão higiênico, evidenciado pela elevada contaminação por bactérias aeróbias mesófilas, bem como coliformes totais e termotolerantes. Estes cultivos, ainda afiguraram prócera contaminação por enteroparasitos, incluindo cistos de *Entamoeba histolytica* e ovos de *Ascaris lumbricóides* e *Taenia* sp. De maneira geral, as amostras do cultivo orgânico foram as mais contaminadas tanto por bactérias como por enteroparasitos. Em contrapartida o menor nível de contaminação para ambos foi observado na alface de cultivo hidropônico. Nas amostras de alface analisadas não foi encontrada *Salmonella* sp, independente do sistema de cultivo. Os resultados evidenciaram que a higienização com água estéril é suficiente para reduzir a carga bacteriana a níveis seguros para consumo humano em alface de sistema hidropônico, porém não é suficiente para amostras dos sistemas tradicional e orgânico. O hipoclorito de sódio e o ácido acético demonstraram um interessante efeito sanitizante eficaz para redução da contaminação bacteriana das amostras de alface dos três cultivos testados.

Considerando que a alface geralmente é consumida em sua forma *in natura*, estes resultados sugerem que o emprego do ácido acético e hipoclorito de sódio para sanitização é uma alternativa eficaz para redução da contaminação microbiana.

## 6 REFERÊNCIAS

- AGUILAR, L. T. **Dieta no risco de desenvolvimento de câncer bucal: estudo caso controle**. 2002. 69f. Dissertação Faculdade de Odontologia (Mestrado em Odontologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. **F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4rd edition, American Public Health Association:** Washington, p. 336-383, 2001.
- AMOAH, P.; DRECHSEL, P.; ABAIDOO, R. C.; NTOW, W. J. Pesticide and pathogen contamination of vegetables in Ghana's urban markets. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 1-6, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry**. Arlington, Virginia, USA. 16 ed., v.2, 1141p., 1995.
- ANDRADE, E. C. B. **Análise de alimentos: uma visão química da nutrição**. São Paulo: Livraria Varela, p. 87, 2006.
- BACHELLI, M. L. B. Sanitização para alface minimamente processada em comparação ao hipoclorito de sódio. **Dissertação. Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP**, 34, 2010.
- BAILINGER, J. Valuer compare des ethodes d'enrichissement en coprologie prarasitaire. **Pharmaceutical Biology**, v. 3, p. 249-259, 1962.
- BALIONI, A. B. Avaliação higiênico-sanitária de alfaces agro-ecológicas e cultivadas com agrotóxicos, comercializadas na região de Campinas - SP. **Higiene Alimentar**. v. 17, p.73-78, 2003.
- BARI, M.L.; NAZUKA, E.; SABINA, Y.; TODORIKI, S.; ISSHIKI, K. Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 on alfafa, radish, and mung bean seed. **Journal of Food Protection**, v.66. n.05, p.767-774, 2003.
- BERBARI, S. A. G.; PASCHOLIANO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 21, 197-201, 2001.
- BERNSTEIN, N.; SELA, S.; PINTO, R.; IOFFE, M. Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. **Journal of Food Protection**. v. 70, p. 471-475, 2007.
- BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**. v. 59, p. 204-216, 1998.

BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1734-1742, 1999.

BJORNSDOTTIR, K. Effects of organic acids on *Escherichia coli* O157: H7 independent of pH under acidified food conditions. 110f. (Master of Science) – Graduate Faculty of North Carolina State University, 2005.

BLUMENTHAL, U. J.; MARA, D. D.; PEASEY, A.; RUIZ-PALACIOS, G.; SLOTT R. **Redução dos riscos para a saúde com a utilização agrícola de águas residuais: mudanças recomendadas nas pautas da organização Mundial da Saúde - OMS.** Disponível em: <[http://www.ipes.org/au/pdfs/raup3/10\\_AU3oms.pdf](http://www.ipes.org/au/pdfs/raup3/10_AU3oms.pdf)>. Acesso em 16 de setembro de 2006.

BRACKETT, R. E. Changes in the microflora of packaged tomatoes. **Journal of Food Quality**, v. 11, p. 80-105, 1988.

BRACKETT, R. E. **Esporos e patógenos microbiológicos em frutas e em vegetais minimamente processados.** In: WILEY, R. C. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. New York: Nostrand Reinhold, p. 269-312, 1994.

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

BRASIL, CONAMA. SEMA. **Resoluções do conselho nacional do meio ambiente e leis**, 1984/86. 2. ed. Brasília, p. 28, 1998.

BRASIL, Anvisa. Resolução RDC n°. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Estabelece Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, p. 45-53, 2001.

BRASIL, Anvisa. Resolução RDC n°. 352, de 23 de dezembro de 2002. Estabelece Boas práticas de fabricação para estabelecimentos de frutas e ou frutas em conserva. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, p. 4-6, 2002.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Legislação. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 20 mar. 2010.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Embrapa, Circular técnica n° 56 novembro de 2007. Cultivo de Alface em Sistema Orgânico de Produção. Brasília. 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 01 de mar 2011.

BRENES, C. H. Good manufacturing practices (GMPS) – **Buenas prácticas para la manipulación, embalaje, almacenamiento y transporte de productos frescos.** In FDA. Food and Drug Administration. Manual de formación para instructores. Campus Monterrey, México, 2002.

BRUGALLI, A.; PINTO, J. M.; TONDO, E. C. Análises de perigos e pontos críticos de controle para garantir a segurança alimentar em restaurante da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 11, p. 53-59, 2000.

CAETANO, L. C. S. **A cultura da alface: perspectivas, tecnologias e viabilidade**. Niterói: Varela, p.23, 2001.

CARLOS, J. V. Porcionamento dos principais alimentos e preparações consumidas por adultos e idosos residentes no município de São Paulo. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 383-391, 2008.

CARRER FILHO, R; ROMEIRO, RS; AMARAL LS; GARCIA FAO. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 340-344, 2009.

CARVALHO, K. L. **Gestão da cadeia produtiva da alface: uma análise sobre a inserção do produtor rural**. 2008. 169p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CARVALHO FILHO, J. L. S.; GOMES, L. A. A.; MALUF, W. R. Tolerância ao florescimento precoce e características comerciais de progênies F4 de alface do cruzamento Regina 71 x Salinas 88. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p. 37-42, 2009.

CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; MARTINS, F. S. V. **Infecções por helmintos e protozoários**. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina. Centro de Informações em Saúde para Viajantes- Cives; 2006.

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

COMETTI, N.N.; MATIAS, G.C.S.; ZONTA, E.; MARY, W.; FERNANDES, M.S. Compostos nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.748-753, out-dez 2004.

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZENS GERAIS DE SÃO PAULO - CEAGESP. **Transporte e logística de alimentos e flores**. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/produtos/produtos/alface/view?searchterm=alface>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 23, 2005.

DARYANI, A.; ETTEHAD, G. H.; SHARIF, M.; GHORBANI, L.; ZIAEI, H. Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. **Food Control**, v. 19, p. 790-794, 2008.

DIMITRIJEVIĆ, S. I.; MIHAJLOVSKI, K. R.; ANTONOVIĆ, D. G.; MILANOVIĆ-STEVAHOVIĆ, M. R.; MIJIN, D. Z. A study of the synergetic antilisterial effects of a

sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 104, p. 774-782, 2007.

DYCHDALA, G. R. **Chlorine compounds** In: BLOCK SS. Disinfection, sterilization and preservation. 5 ed. Philadelphia, p. 1162, 2001.

EMBRAPA. **Circular técnica n° 56 novembro de 2007**, Cultivo de Alface em Sistema Orgânico de Produção. 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: 23 abr. 2011.

ERDOGRUL, O.; SENER, H. The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolyca* cysts and *Giardia* cysts. **Food Control**, v. 16, p. 557-560, 2004.

FALAVIGNA, L. M.; FREITAS, C. B. R.; MELO, G. C.; NISHI, L.; ARAÚJO, S. M.; FALAVIGNA, A. L. G. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. **Parasitol latinoam**. v. 60, p.144-149, 2005.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The special programme for food security**. Disponível em: <<http://www.fao.org/spfs/>>. Acesso em: 23 mar. 2011.

FEIDEN, A. Conversão de Sistemas de Produção Convencionais para Sistemas de Produção Orgânicos. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, p. 20, 2001.

FERNANDES, A. A. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidropônia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 195-200, 2002.

FERREIRA, M. E.; CASTELLANE, P. D.; CRUZ, M. C. P. **Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba: Potafos, p.201, 2004.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura**. São Paulo: Ed. Agrômica Séries, 2ª. Ed. p. 137, 2003.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, p. 112, 2002.

FRANCIS, G. A.; THOMAS, C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Review article. **International Journal of Food Science and Tecnology**, v. 34, p. 1-22, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, p. 86-93, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 182, 2005.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, p. 87, 2007.

FREITAS, A. A.; KWIATKOWSKI, A.; COUTINHO, S. N.; SIMONELLI, S. M.; SANGIONI, L. A. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do município de Campo Mourão, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, p.381-384, 2004.

FRÖDER, H.; MARTNS, C. G.; SOUZA, K. L.; LANDGRAF, M. FRANCO, B. D.; DESTRO, M. T. Minimally processed vegetables salads: microbial quality evaluation. *Journal of Food Protection*. v.70, p.1277-1280, 2007.

GAGLIARDI, J. V.; KARNS, J. S. Leaching of *Eschericia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management pratices. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 66, p. 877-883, 2000.

GARCIA, J. L. ONO, L. M.; ZULPO, D. L.; PERETTI, J. 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.

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

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; FIGUEIREDO, H. C. P.; COSTA, G. M.; RODRIGUES, L. S. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 132-135, 2003.

GUIRALDO, N.; AMBROSANO, E. J.; MENDES, P. C. D.; ROSSI, F.; AVÉRALO, R. A. Medidas de controle de doenças em sistema agroecológicos. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.30, p.153-156, 2004.

IBENYASSINE, K.; MHAND, R. A.; KARAMOKO, Y.; ANAJJAR, B.; CHOUIBANI, M. M.; ENNAJI, M. Bacterial pathogens recovered from vegetables irrigated by wastewater in Morocco. *Journal of Environmental Health*, v. 69, p. 47–51, 2007.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação**, p. 370, 2009.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Aquisição Alimentar Domiciliar per Capita Brasil e Grandes Regiões**, p. 54, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 578, 2005.

KENNEY S. J.; ANDERSON, G.; WILLIAMS, P.; MILLNER, P.; BEUCHAT, L. Migration of *Caenorhabditis elegans* to manure and manure compost and potential for transport of *Salmonella* newport to fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, p. 61-68, 2006.

KESKINEN, L. A.; BURKE, A.; ANNOUS, B. A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p.134-140, 2009

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1071-1087, 1999.

KLERKS, M. M.; FRANZ, E.; VAN GENT-PELZER.; ZIJLSTRA, C.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. **ISME J.**, v. 1, p. 620-631, 2007.

LEITÃO, M. F. F.; MONTEIRO FILHO, E.; DELAZARI, I.; ANGELUCCI. Eficiência de sanitizantes na redução da contaminação bacteriana da alface. **Brazilian Journal Food and Technology**, 18, 201-226, 1981.

LONCAREVIC, S.; JOHANNESSEN, G. S.; RORVIK, L. M. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 186–89, 2005.

LOPES, J. C. RIBEIRO, L. G.; ARAÚJO, M .G.; BERALDO, M. R. B.S. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 143-147, 2005.

LOPÉZ-GALVÉZ, F.; ALLENDE, A.; TRUCHADO, P.; MARTINEZ-SÁNCHEZ, A., TUDELA, J. A.; SELMA, M. V. Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. **Postharvest Biology and Technology**, v.55, p.53-60, 2010.

LÜCK, E., JAGER, M. Conservación química de los alimentos: características, uso, efectos. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 2002.

MACHADO, E. L. **O papel da reputação na coordenação vertical da cadeia produtiva de frutas, legumes e verduras**. 2002. 182p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MAGKOS, F.; ARVANITI, F.; ZAMPELAS, A. Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. **International Journal Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 357-371, 2003.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v. 3, p. 219-224, 2001.

MARKOVA, Y. A.; ROMANENKO, A. S.; DUKHANINA, A. V. Isolation of bacteria of the family *Enterobacteriaceae* from plant tissues. **Microbiology**, v. 74, p. 575–78, 2005.

MARQUELLI, W. A.; SILVA, W. L. C.; SILVA, H. R.; VILELA, N. J. Eficiência econômica do manejo racional da irrigação em tomateiro para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, v. 18, p. 238-243, 2000.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, p. 151, 2005.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; CHITARRA, A. B.; PRADO, M. E. T. Qualidade de alface crespa minimamente processada armazenada sob refrigeração em dois sistemas de embalagem. **Horticultura Brasileira** v. 25, p. 85-91, 2007.

MEYER, S.T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n.01, p.99-110, 1994.

MIYAZAWA, M.; KHATOUNIAN, C. A.; ODENATH-PENHA, L. A. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. **Agroecologia Hoje**, v. 2, p. 23-30, 2001.

MORETTI, C. L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças** - Brasília: Embrapa Hortaliças e SEBRAE, 2007.

MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; SILVA, E. C.; CARVALHO, J. G.; YURI, J. E. Efeito do cloreto de potássio via fertirrigação na produção de alface americana em cultivo protegido. **Ciência Agrotécnica**, v. 25, p. 542-549, 2001.

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

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, K. C. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal Food Technology**, n. 1, p. 63-68, 2003.

NAKAI, S. A.; SIEBERT, K. J. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 249-255, 2003.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J. L.; DUBOIS-BRISSONNET, F. **Food Microbiology**. v. 22, p. 391-398, 2005.

NOGUEIRA, M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; AMARAL, L. A.; NASCIMENTO, A. A. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de hortaliças e da água utilizada em hortas da cidade de Jaboticabal, SP. **Higiene Alimentar**, v. 19, p.108-114, 2005

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, p. 57-71, 1998.

OLIVEIRA, M.; USALL, J.; VIÑAS, I.; ANGUERRA, M.; GATIUS, F.; ABADIAS, M. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**, v. 27, p. 679-684, 2010.

ONO, L. M.; ZULPO, D. L.; PERETTI, J.; GARCIA, J. L. Ocorrência de helmintos e protozoários em hortaliças cruas comercializadas no município de Guarapuava, Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**. v. 26, p.543-546, 2005.

ORNELLAS, L. H. **A alimentação através dos tempos**. 2. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, p. 231-244, 2006.

PATEKOSKI, K. S.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. Patogenicidade *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.). **Hoehnea**, v. 36, p. 161-172, 2009.

PAULUS, D.; DOURADO NETO, D.; FRIZZONE, J. A.; SOARES, T. M. Produção e indicadores fisiológicos de alface sob hidroponia com água salina. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 29-35, 2010.

PENTEADO, S. R. **Introdução à agricultura orgânica**. Campinas: Grafimagem, p. 110, 2000.

PINTO, A. F. M. A. **Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos**. Millenium on line, n.4, 1996. p. 91-100. Disponível em: <[http://www.ipv.pt/millenium/Millenium\\_4.htm](http://www.ipv.pt/millenium/Millenium_4.htm)> Acesso em: 18 out. 2010.

PORTO, E.; EIROA, M. N. U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Vegetables. **Food and Environmental Sanitation**, v. 21 p. 282-286, 2006.

PRADO, S. P. T.; RIBEIRO, E. G. A.; CAPUANO, D. M.; AQUINO, A. L.; ROCHA, G. M; BERGAMINI, A. M. M. Microbiological and parasitic quality and labeling adequacy of minimally-processed vegetables, commercialized in Ribeirão Preto, SP/Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.67, p.221-227, 2008.

PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS (PIF). **Frutas e hortaliças: fonte de prazer e saúde**. São Paulo: PIF Logística Pós-colheita, p. 6, 2006.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v.17, p.359-364, 2006.

REZENDE, C. L.; FARINA, E. M. M. Q. **Assimetria Informacional no Mercado de Alimentos Orgânicos**. In: II Seminário Brasileiro da Nova Economia Institucional, UNICAMP, 2001.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, p. 632-639, 2003.

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, p. 151-160, 2008.

ROMEIRO RS. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV. p. 165, 2005.

ROSA, C. C. B.; MARTINS, M. L. L.; FOLLY, M. M. Avaliação microbiológica de hortaliças provenientes de hortas comunitárias de Campos dos Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, v. 134, p.75-80, 2001.

ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P. características microbiológicas de frutos e hortaliças minimamente processados. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 34, p. 84-92, 2000.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 71, p. 191-201, 1991.

SAKATA - SAKATA SEED SUDAMERICA. **Tipos de hortaliças**. Bragança Paulista - SP, 2007.

SALINAS, R. D. **Alimentos e Nutrição: Introdução a Bromatologia**. 3º ed. Porto Alegre: Artmed, p. 178-180, 2002.

SANT'ANA, A.; AZEVEDO, D. P.; COSTA, M.; MACEDO, V. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. **Higiene Alimentar**, v. 16, p. 50-55, 2002.

SANTANA, L. R. R.; CARVALHO, R. D. S.; LEITE, C. C.; ALCÂNTARA, L. M.; OLIVEIRA, T. W. S.; RODRIGUES, B. M. Physical, microbiological and parasitological quality of lettuce (*Lactuca sativa*) from different growing processes. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 264-269, 2006.

SANTOS, Y. T. L. Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli*. Salvador. **Dissertação. Universidade Federal da Bahia-UFBA**, 46, 2007.

SAO PAULO. Secretária de Saúde. **Resolução SS - 196/98**, publicado no Diário Oficial do Estado de São Paulo. p. 21, 1999.

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

SILVA JUNIOIR, E. O. Vias de transmissão. In: **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: varela, 2001. P. 13-14.

SILVA, S. R. P. Avaliação bacteriológica e parasitológica em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Porto Alegre-RS. Dissertação. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul. PUC-RS**, 62, 2006.

SILVA, S. R. P.; VERDIN, S. E. F.; PEREIRA, D. C.; SCHATKOSKI, A. L.; ROTT, M. B. CORÇÃO G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 594-8, 2007.

SMANIOTO, T. F.; PIROLO, N. J.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ARRUDA, M. C. Microbiological quality of minimally processed fruits and vegetables. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, p.150-154. 2009.

SOARES, B.; CANTOS, G. A. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 455-460, 2005.

SOARES, T. M.; DUARTE, S. N.; SILVA, E. F. F.; JORGE, C. A. Combinação de águas doce e salobra para produção de alface hidropônica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.705-714, 2010.

SORIANO, J. M. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. **Food Microbiology**, v. 18, p. 159-163, 2001.

TAKAYANAGUI, O. M.; OLIVEIRA, C. D.; BERGAMINI, A. M. N.; CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H. T.; FEBRÔNIO, L. H. P.; SILVA, A. A. M. C. C.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, E. G. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 37-41, 2001.

TAKEUCHI, K.; FRANK, J. F. Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157: H7 from chlorine disinfection. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 147-151, 2001.

UNLUKARA, A.; CEMEK, B.; KARAMAN, S.; ERSAHIN, S. Response of lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) to salinity of irrigation water. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.36, p.265-273, 2008.

VANDERZANT, C., SPLITTOESSER, D. F. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. in: APHA/TCMMF. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington 2001a.

VANDERZANT, C.; SPLITTOESSER, D. F. *Salmonella*. in: APHA/TCMMF. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington 2001b.

YURI, J. E.; RESENDE, G. M.; RODRIGUES JÚNIOR, J. C.; MOTA, J. H.; SOUZA, R. J. Efeito de composto orgânico sobre a produção e características comerciais de alface americana. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 127-130, 2004.