



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE NUTRIÇÃO**

**YTANA TADEU OLIVEIRA SANTOS**

**QUALIDADE SANITÁRIA DE HORTALIÇAS CULTIVADAS EM  
UM DISTRITO SANITÁRIO DE SALVADOR-BA E EFICIÊNCIA  
DE SOLUÇÕES ANTIMICROBIANAS SOBRE LINHAGENS DE  
*ESCHERICHIA COLI***

Salvador  
2007

**YTANA TADEU OLIVEIRA SANTOS**

**QUALIDADE SANITÁRIA DE HORTALIÇAS CULTIVADAS EM  
UM DISTRITO SANITÁRIO DE SALVADOR-BA E EFICIÊNCIA  
DE SOLUÇÕES ANTIMICROBIANAS SOBRE LINHAGENS DE  
*ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida  
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Salvador  
2007

---

S237

Santos, Ytana Tadeu Oliveira

Qualidade Sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador-Ba e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de Escherichia coli / Ytana Tadeu Oliveira Santos. – Salvador, 2007.  
85 f.

Orientador: Profa. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição, 2007.

1. Microbiologia de Alimentos. 2. Hortaliças. 3. Irrigação (Agricultura). I. Universidade Federal da Bahia - Escola de Nutrição. II. Almeida, Rogeria Comastri de Castro. III. Almeida, Paulo Fernando de. IV. Título.

CDU: 664

---

YTANA TADEU OLIVEIRA SANTOS

QUALIDADE SANITÁRIA DE HORTALIÇAS CULTIVADAS EM UM DISTRITO  
SANITÁRIO DE SALVADOR-BA E EFICIÊNCIA DE SOLUÇÕES ANTIMICROBIANAS  
SOBRE LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI*

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia.

Banca examinadora:

**Rogéria Comastri de Castro Almeida**

Doutora em Engenharia de Alimentos (Universidade Estadual de Campinas)  
Universidade Federal da Bahia

**Aláise Gil Guimarães**

Doutora em Tecnologia de Alimentos (Universidade Estadual de Campinas)  
Universidade Federal da Bahia

**Elisa Teshima**

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Universidade Federal de Viçosa)  
Universidade Estadual de Feira de Santana

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.

Aos meus pais, Gildo e Sônia que sempre me apoiaram e, com muito esforço, conseguiram proporcionar tudo o que tenho hoje.

Ao meu companheiro Fábio pela paciência e carinho dispensado.

Ao meu amigo Augusto, pelo incentivo para a realização deste trabalho, pela força, ajuda e disponibilidade desde o início desta batalha.

A todos os colegas da Vigilância Sanitária, especialmente da Vigilância Sanitária de Salvador, pela árdua e gratificante missão da proteção e defesa da saúde.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado tanto nesta vida.

A minha orientadora, Profa.. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida, pelo incentivo, ajuda e pelos momentos de preciosa orientação no decorrer deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos, pela compreensão e paciência pelas minhas faltas durante o convívio familiar nos longos períodos em que fiquei envolvida com as atividades necessárias à realização desta pesquisa;

A minha grande colega e amiga Clotilde pelo apoio nas horas difíceis, incentivo e ajuda nos momentos críticos desta batalha.

Aos meus amigos e colegas Augusto e Antônia Maria pela força, ajuda, carinho e apoio que sempre me ofereceram.

A Vigilância Sanitária do Município de Salvador-Ba pela imensa colaboração para a execução deste trabalho.

A toda a equipe do Distrito Sanitário Cabula Beiru em especial a Dra. Fátima Moraes, Irani Ferreira e colegas da vigilância sanitária pela colaboração e apoio.

A equipe do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismo (LABEM), em especial ao Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida e a aluna Jaqueline, pela disponibilidade do laboratório e pela ajuda prestada.

Ao Laboratório Central Gonçalo Muniz - LACEN e sua equipe pela disponibilidade do laboratório e pela colaboração prestada.

Ao amigo Lucas Assis pela importante ajuda e disponibilidade sempre.

A Karine Nogueira, pela preciosa ajuda durante a execução das análises.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano da Universidade Estadual de Campinas pela colaboração na realização das análises para a detecção de citotoxinas.

A Profa. Dra. Rizia de Cássia Vieira Cardoso pela ajuda e apoio dispensados no início do mestrado.

Ao Prof. Dr. Gilênio e Profa. Dra. Luciara pela colaboração na condução das análises estatísticas.

Ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Alimentos e Saúde da Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade de realização deste mestrado.

A todos os demais que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Quem me dera ao menos uma vez que o simples fosse visto como o mais importante...”.

Renato Russo

## RESUMO

O consumo de hortaliças cruas constitui um importante meio de transmissão de várias doenças infecciosas, dentre estas se destacam aquelas provocadas por bactérias patogênicas, ocasionando com frequência surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA). Deficiências no controle em qualquer uma das etapas da produção podem comprometer a qualidade sanitária das hortaliças. Nas hortas existentes em nosso meio observam-se práticas agrícolas inadequadas durante a produção das hortaliças, dentre estas a utilização de água contaminada, comprometendo a qualidade final dos produtos. Desta forma, torna-se necessário o controle durante todas as etapas que precedem o consumo, incluindo a lavagem e sanitização adequadas destes vegetais. O cloro é um dos principais agentes sanitizantes permitido pela legislação brasileira, porém atualmente, seu uso vem sendo contestado devido à possibilidade da formação de substâncias carcinogênicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária de hortas, hortaliças e água de irrigação e a eficácia sanitizante de produtos contendo ácidos orgânicos de cadeia curta sobre linhagens de *Escherichia coli* inoculadas artificialmente em alface. Foram investigadas cinco hortas, 140 amostras de hortaliças distribuídas entre alface, coentro, couve e hortelã, e 45 amostras de água de irrigação. Para avaliação da qualidade sanitária das hortas foi aplicado um “check-list” e para avaliar as hortaliças e águas de irrigação foram conduzidas análises microbiológicas pertinentes. Em etapa posterior, foi investigada a eficácia sanitizante de ácidos orgânicos de cadeia curta sobre duas linhagens de *Escherichia coli* inoculadas separadamente em alface e em seguida submetidas aos tratamentos por 15 minutos, empregando soluções de vinagre de álcool, suco de limão, mistura suco de limão e vinagre (1:1) e mistura suco de limão, vinagre e água (1:1:1). Os resultados demonstraram que 40% das hortas apresentam condições higiênico-sanitárias totalmente insatisfatórias e as análises microbiológicas revelaram elevados índices de contaminação por coliformes termotolerantes nas hortaliças com 82% de amostras contaminadas, contagens entre < 0,3 a 1500 NMP/g, presença de *E. coli* em 32% das amostras e ausência de *Salmonella* spp. Na água de irrigação também foram encontrados índices elevados de coliformes termotolerantes, com 87% de amostras contaminadas, contagens entre < 2 a 2100 NMP/100 mL, e presença de *E. coli* em 56% das amostras. Um total de 69% das amostras das águas não atendeu ao padrão vigente para coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos a partir do check-list não foram condizentes com as análises microbiológicas. Quanto aos tratamentos com as soluções antimicrobianas, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os agentes testados, contudo, as maiores reduções decimais (RD) foram obtidas com o tratamento empregando suco de limão e vinagre sobre a cepa *E. coli* O157: H7, valor médio de 3,25 ciclos logarítmicos. Para a cepa *E. coli*-Ls o melhor tratamento foi aquele empregando o vinagre, alcançando uma RD de 1,51 ciclos log. Dos resultados apresentados conclui-se que é necessária uma maior atenção por parte das autoridades competente na produção de hortaliças, para o fornecimento de alimentos seguros à população. Quanto ao uso das soluções antimicrobianas, conclui-se que se trata de uma boa opção em substituição ao uso do cloro na sanitização de hortaliças folhosas, necessitando, entretanto de mais estudos para a sua viabilização junto às indústrias de alimentos e serviços de alimentação.

**Palavras-chave:** Qualidade sanitária; Hortaliças; Água de irrigação; Sanitização, *Escherichia coli*.



## ABSTRACT

The consumption of raw vegetables is surely an important mean to transmit several infectious diseases, among them must be highlight the ones caused by pathogenic bacteria, which frequently cause outbreaks of foodborne diseases. Deficiencies regarding the control of any of the stages of production may harm vegetables sanitary quality. Among the patches observed it can be notice inadequate practices while growing the vegetables such as the use of contaminated water, which may affect the quality of the products to be harvested. This way, there is a strong necessity in order to control all the stages which precede consumption, including the adequate washing and sanitization of such vegetables. Chloral is one of the main sanitization agents allowed by Brazilian laws. However, currently, its use has been contested due to the possibility to form carcinogenic substances. This work aims to evaluate the hygienic-sanitary quality of patches, vegetables and irrigation water and the sanitizing efficacy of products containing simple series organic acids against *Escherichia coli* strains artificially inoculated in lettuce plots. Five patches have been investigated, 140 samples of vegetables ranging from lettuce, cilantro, savoy cabbage and mint, and 45 samples of irrigation water. A check-list form was used in order to evaluate the sanitary quality of vegetable patches and the adequate microbiological analysis to investigate the vegetables themselves as well as irrigation water. Afterwards, the object investigated was the sanitizing efficacy of organic acids against two *Escherichia coli* strains inoculated separately in lettuce, which were after submitted to a 15-minute treatment consisting on the application of alcohol vinegar, lemon juice, a mix of lemon juice and vinegar (1:1), as well as lemon juice, vinegar and water (1:1:1). Results showed that 40% of the patches present unsatisfactory hygienic-sanitary conditions and the microbiological analysis revealed high rates of contamination for thermotolerant coliforms in vegetables with 82% of samples infected, counts between  $< 0.3$  and  $> 1500$  MPN/g, presence of *E. coli* in 32% of the samples and the absence of *Salmonella* spp. In irrigation water there were also found high rates of thermotolerant coliforms, with 87% of the samples contaminated, counts between  $< 2$  and 2100 MPN/100 mL, and the presence of *E. coli* in 56% of the samples. A total of 69% of the water samples did not in compliance to the existing standards of thermotolerant coliforms. The results obtained over the check-list haven't machted with the microbiological analyses. Concerning the treatment with antimicrobial solutions, it has been verified that there was no significant statistic difference ( $p < 0, 05$ ) among the tested agents. However, the highest decimal reductions (DR) was obtained with the treatment using lemon juice and vinegar against *E. coli* O157: H7, average number of 3.25 logarithmic cycles. To *E. coli*-Ls strain the best treatment is the one using vinegar, reaching a DR of 1.51 log cycles. Based on the results presented, the conclusion is that government authorities and entities in charge of vegetables cultivation must dedicate more attention to it in order to provide safe products to the population. Regarding the use of antimicrobial solutions used we conclude that it is a good option in order to substitute the use of Chloral in the sanitization of vegetables. This would demand more studies to its effective use among the food industry and services related to this matter.

**Key-words:** Sanitary quality, vegetables, irrigation water, sanitization, *Escherichia coli*

## LISTA DE TABELAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| TABELA 1  | Caracterização das hortas do Distrito Sanitário Cabula Beiru (DSCB) de Salvador - Ba e avaliação pelo “check-list”.   | 49 |
| TABELA 2  | Distribuição da ocorrência de coliformes termotolerantes em hortas do Distrito Sanitário de Salvador - BA, de acordo com o tipo de hortaliça estudada.                          | 52 |
| TABELA 3  | Valores mínimos e máximos do Número Mais Provável (NMP)/ g de coliformes termotolerantes em hortaliças cultivadas em hortas do DSCB de Salvador – Ba.                           | 53 |
| TABELA 4  | Ocorrência de coliformes termotolerantes em hortaliças de acordo com a horta do DSCB de Salvador - Ba.  | 54 |
| TABELA 5  | Presença de <i>Escherichia coli</i> de acordo com o tipo de hortaliça cultivada em hortas do DSCB de Salvador – Ba.   | 55 |
| TABELA 6  | Presença de <i>Escherichia coli</i> em hortaliças de acordo com as hortas do DSCB de Salvador - Ba.   | 56 |
| TABELA 7  | Valores mínimos e máximos do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes em águas de irrigação, utilizadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba. | 59 |
| TABELA 8  | Frequência de coliformes totais e coliformes termotolerantes em águas de irrigação utilizadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba.   | 59 |
| TABELA 9  | Frequência de <i>Escherichia coli</i> em águas de irrigação utilizadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba.  | 60 |
| TABELA 10 | Percentual de amostras da água de irrigação que não atenderam ao padrão microbiológico para coliformes termotolerantes (CONAMA, 2005).  | 62 |
| TABELA 11 | Eficácia dos tratamentos sobre <i>Escherichia coli</i> O157: H7 inoculada artificialmente em folhas de alface, após 15 minutos de contato.                                      | 65 |
| TABELA 12 | Eficácia dos tratamentos sobre <i>Escherichia coli</i> -Ls inoculada artificialmente em folhas de alface, após 15 minutos de contato  | 67 |

## LISTA DE FIGURAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| FIGURA 1 | Preparo da suspensão bacteriana   | 44 |
| FIGURA 2 | Ocorrência de coliformes termotolerantes de acordo com o tipo de hortaliça                                      | 51 |
| FIGURA 3 | Ocorrência de <i>E. coli</i> de acordo com o tipo de hortaliça cultivada em hortas do DSCB / Salvador-Ba        | 55 |
| FIGURA 4 | Ocorrência de coliformes totais e termotolerantes em água de irrigação de hortas do DSCB / Salvador-Ba          | 60 |
| FIGURA 5 | Ocorrência de <i>E. coli</i> na água de irrigação   | 61 |
| FIGURA 6 | Percentual de amostras de água de irrigação que não atenderam ao padrão da CONAMA                               | 62 |
| FIGURA 7 | Eficácia dos tratamentos sobre <i>E. coli</i> O157:47 e <i>E. coli</i> -Ls inoculadas artificialmente em alface | 57 |

## SUMÁRIO

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO  | 11 |
| 2     | OBJETIVOS   | 13 |
| 2.1   | Objetivo geral  | 13 |
| 2.2   | Objetivos específicos   | 13 |
| 3     | REFERENCIAL TEÓRICO   | 14 |
| 3.1   | Hortaliças  | 14 |
| 3.2   | Qualidade sanitária das hortaliças  | 15 |
| 3.2.1 | Bactérias do grupo coliforme/ <i>Escherichia coli</i>   | 17 |
| 3.2.2 | <i>Salmonella</i> spp.  | 21 |
| 3.3   | Práticas agrícolas: Condições higiênicas sanitárias dos locais de produção, insumos e manipuladores.  | 23 |
| 3.4   | Água de irrigação   | 24 |
| 3.4.1 | Qualidade microbiológica e doenças veiculadas pela água de irrigação                                  | 25 |
| 3.5   | Considerações sobre o controle sanitário na produção de hortaliças e doenças veiculadas por alimentos | 28 |
| 3.6   | Sanitização de hortaliças   | 30 |
| 3.6.1 | Agentes sanitizantes e a sua eficiência na eliminação de patógenos                                    | 31 |
| 4     | MATERIAL E MÉTODOS  | 35 |
| 4.1   | Material  | 35 |
| 4.1.1 | Alimentos   | 35 |
| 4.1.2 | Cepas dos microrganismos de referência  | 35 |
| 4.1.3 | Soluções de tratamento  | 35 |
| 4.1.4 | Meios de cultura e reagentes  | 35 |
| 4.1.5 | Equipamentos  | 37 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.2   | Métodos  | 38 |
| 4.2.1 | Local de estudo  | 38 |
| 4.2.2 | Desenho de estudo  | 38 |
| 4.2.3 | Cadastramento e caracterização higiênico-sanitária das hortas  | 38 |
| 4.2.4 | Investigação higiênico-sanitária das hortaliças e da água de irrigação   | 39 |
| 4.2.5 | Investigação da eficiência sanitizante de soluções contendo ácidos orgânicos sobre <i>E. coli</i> O157: H7 e <i>E. coli</i> isolada de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ). | 44 |
| 4.2.6 | Investigação da presença de citotoxinas nas cepas isoladas de <i>E. coli</i> .   | 46 |
| 5     | RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 48 |
| 5.1   | Caracterização e investigação das condições higiênico-sanitárias das hortas  | 48 |
| 5.2   | Investigação da qualidade higiênico-sanitária das hortaliças   | 51 |
| 5.3   | Investigação da qualidade sanitária da água de irrigação   | 58 |
| 5.4   | Avaliação da eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de <i>Escherichia coli</i> inoculadas artificialmente em alface                                      | 64 |
| 6     | CONCLUSÃO  | 72 |
| 7     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 74 |
|       | APÊNDICE   |    |
|       | ANEXOS   |    |

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de hortaliças vem sendo cada vez mais incentivado no mundo atual diante de todos os seus benefícios nutricionais conhecidos. Porém, principalmente as hortaliças folhosas, constituem um importante meio de transmissão de várias doenças toxinfeciosas, tendo sido reportadas como fonte potencial de microrganismos patogênicos, contribuindo para a elevação dos casos de doenças veiculadas por alimentos (DVAs) (FDA, 1998; BUCK, WALCOTT & BEUCHAT, 2003).

A contaminação microbiológica é uma das mais relevantes para a saúde pública, considerando os elevados índices de doenças veiculadas por alimentos (DVAs), provocados por microrganismos patogênicos em todo o mundo (OMS, 2003). O consumo de verduras cruas desempenha um importante papel na transmissão de várias doenças toxinfeciosas, destacando-se a prática freqüente da irrigação de hortas com águas contaminadas como uma das principais fontes de contaminação das mesmas (AMORIM, 2003; BASTOS, 2002).

Os riscos microbianos que afetam a segurança dos alimentos podem estar presentes em qualquer ponto da cadeia produtiva, desde o cultivo, colheita, lavagem, armazenamento, transporte, comercialização, e finalmente na mesa do consumidor (RANTHUM, 2002).

As pesquisas existentes em nosso meio para avaliar a qualidade sanitária de hortaliças, em sua grande maioria, só ocorrem nos locais de distribuição e comercialização das mesmas, poucas se referem ao local de cultivo ou início da cadeia produtiva, onde deveria ter seu controle e monitoramento iniciados. Portanto, de um modo geral, dentre os fatores que concorrem para a contaminação de hortaliças, devem ser investigados o meio ambiente em que as mesmas são produzidas, destacando-se a água de irrigação, a situação higiênico-sanitária das hortas, as práticas agrícolas empregadas como também a situação de saúde e hábitos higiênicos dos trabalhadores das hortas.

No Distrito Sanitário Cabula Beiru (DSCB), município de Salvador-Bahia, a horticultura é uma prática visível. Fatores culturais, alternativas de sustentabilidade, condições de clima e solo favoráveis, contribuem para esta atividade neste local. Seus produtos são consumidos pela população local e distribuídos para centros de abastecimento em Salvador e adjacências.

No DSCB as hortas estão localizadas em regiões de declives, onde geralmente vivem pessoas de baixa renda, sem ordenamento do uso do solo, saneamento básico precário e ausência de outros serviços públicos fundamentais. O destino dos esgotos e águas servidas é feito com frequência em rios e riachos locais, contaminando as águas superficiais e lençóis freáticos com material fecal. Por sua vez, a grande maioria dos produtores, pela dificuldade ao acesso ou por desinformação, utiliza destas águas adjacentes às hortas para irrigá-las, sem nenhum tratamento prévio, fato que repercutirá na qualidade sanitária das hortaliças produzidas. Contudo, mesmo existindo um controle sanitário nestas etapas que antecedem a oferta final do produto, é difícil garantir que estes alimentos cheguem inócuos à mesa do consumidor. Dessa forma, a prática da sanitização deve ser utilizada como complementação às boas práticas de produção (BPF), visando reduzir com maior segurança a presença de microrganismos patogênicos no alimento.

O processo de sanitização das hortaliças é considerado uma etapa crítica para a segurança no consumo do alimento e a seleção dos sanitizantes a serem empregados deve ser baseada não apenas na eficácia dos mesmos, mas também na segurança do ponto de vista toxicológico (NASCIMENTO, 2002). O hipoclorito de sódio é o agente mais comumente empregado, porém além de possuir efeito limitado sobre determinados microrganismos, pode produzir substâncias denominadas trihalometanos, comprovadamente carcinogênicas (FERRARIS et al., 2005; DUNNICK & MELNICK, 1993).

Considerando-se o fato acima citado, há um interesse por parte das indústrias de alimentos em desenvolver sanitizantes alternativos que sejam mais eficazes que o hipoclorito de sódio para reduzir ou eliminar patógenos humanos em produtos frescos, e que não possuam efeitos deletérios à saúde. Os ácidos orgânicos de cadeia curta, por serem considerados substâncias reconhecidas como seguras (GRAS), têm sido muito utilizados como alternativa em estudos de redução da população bacteriana em alimentos.

Diante do exposto, realizou-se esse estudo para investigar a qualidade higiênico-sanitária de hortaliças e água de irrigação das mesmas, através de análises microbiológicas, avaliando-se também as condições ambientais e higiênico-sanitárias das hortas que as produziam. Também foi objeto desse estudo a avaliação da ação sanitizante de produtos contendo ácidos orgânicos de cadeia curta e sua combinação sobre linhagens de *Escherichia coli*, inoculadas artificialmente em folhas de alface (*Lactuca sativa*).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade higiênico-sanitária de hortas, hortaliças e água de irrigação e a eficácia sanitizante de produtos contendo ácidos orgânicos de cadeia curta sobre linhagens de *Escherichia coli* inoculadas artificialmente em alface (*Lactuca sativa*).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as condições higiênico-sanitárias de hortas através da aplicação de formulário semi-estruturado do tipo “check-list”.
- Avaliar as condições higiênico-sanitárias das hortaliças investigando a presença de *Salmonella* spp. e o Número Mais Provável de coliformes termotolerantes/ *E. coli*.
- Avaliar as condições higiênico-sanitárias da água de irrigação investigando o Número Mais Provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes/ *E. coli*.
- Comparar os resultados encontrados com os padrões microbiológicos vigentes.
- Avaliar a eficácia sanitizante de vinagre, suco de limão, mistura vinagre e suco de limão, e mistura vinagre, suco de limão e água, sobre duas linhagens de *Escherichia coli* inoculadas artificialmente em alface.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Hortaliças

Originária da Europa e da Ásia, a alface (*Lactuca sativa*) pertence à família *Asteracea* e é a verdura mais consumida no Brasil (EMBRAPA, 2006). A alface possui um caule diminuto ao qual se prendem as folhas, podem ser do tipo lisa ou crespa, fechando-se ou não na forma de um cone. A coloração das plantas pode variar do verde-amarelado até o verde escuro e também pode ser roxa, dependendo do cultivar. É classificada comercialmente em Americana, Crespa, Lisa, Mimosa e Romana. Desses tipos, o mais consumido é a alface Crespa (TRANI et al., 2005).

O Coentro (*Coariandrum sativum L.*), também conhecido como cheiro-verde pertence à família *Apiaceae*, foi originado do sul europeu e do oriente e, acredita-se que chegou ao Brasil trazido pelos portugueses (EMBRAPA, 2006). É uma hortaliça bastante usada como condimento em todo o Brasil, principalmente nas regiões norte e nordeste e em menor proporção no sudeste. Suas folhas são bastante utilizadas na culinária, em diversos pratos típicos, no tempero de carnes além de molhos e saladas. Já a sua semente é bastante útil na indústria de condimento para a carne defumada, fabricação de pães, doces e licores finos (ALVES et al., 2005).

A couve (*Brassica oleracea*), originária da costa do Mediterrâneo, é uma planta que apresenta grande diversidade, sendo a “couve manteiga” como um dos 22 tipos encontrados no Brasil, a mais comumente produzida e consumida. Possui folhas verde-claras, tenras, lisas ou pouco onduladas, com pecíolo e nervuras verde-claras (EMBRAPA, 2006). Seu uso é muito apreciado em todo o Brasil na forma de salada crua, cozida ou na elaboração de sucos.

A hortelã (*Menta villosa*), originária da Ásia e Europa, é uma planta medicinal e aromática cultivada também em todo o Brasil e largamente utilizada pelas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos (PAULUS, 2005). Como alimento, seu uso é muito apreciado como tempero em diversas preparações e também como ingrediente na elaboração de sucos em combinação com algumas frutas.

Segundo Moretti (2003), as hortaliças constituem parte integrante da dieta da população mundial. No Brasil, de acordo com o último levantamento realizado através da Pesquisa de Orçamento Familiar (2003), o consumo de frutas e hortaliças ainda se encontra abaixo dos níveis recomendados. Na Bahia de acordo com as informações da Central de Abastecimento S.A. (CEASA, 2005), entre o período de 2002 a 2005, houve um crescimento significativo na comercialização de hortaliças folhosas como a alface, coentro, couve e hortelã.

Em relação às recomendações diárias na ingestão de hortaliças, as diretrizes dietéticas atuais recomendam a diminuição do consumo de gordura, açúcar e sal, manutenção do peso desejável e aumento do consumo de hortifrutigranjeiros e grãos (WHO, 2003). Ao mesmo tempo em que os benefícios de saúde relacionados ao consumo destes produtos já estão claramente estabelecidos, é necessário garantir também que as mesmas apresentem uma qualidade sanitária adequada, visando garantir o fornecimento de um alimento seguro à saúde dos comensais.

### **3.2 Qualidade sanitária das hortaliças**

A alimentação tem sido motivo de preocupação em vários países do mundo (WHO, 2003) e adequar a produção de alimentos à demanda crescente da população tem sido um grande desafio. Entretanto, este desafio não se resume apenas em atender a essa nova demanda, mas também em oferecer alimentos com qualidade satisfatória e livres de agentes contaminantes (BALBANI & BUTUGAN, 2001).

Com o processo de globalização atual, verificou-se uma maior preocupação com a segurança alimentar, tanto no aspecto quantitativo ligado a oferta do alimento, quanto no aspecto qualitativo, o que torna mais evidente os problemas relativos à qualidade dos alimentos para consumo humano (CAVALCANTI, 2004).

Nesse último aspecto, as principais preocupações a respeito das contaminações alimentares estão centradas geralmente em torno dos riscos de contaminação microbiológica, resíduos de pesticidas, utilização inadequada de aditivos alimentares, contaminantes químicos incluindo as toxinas biológicas, adulterações e mais recentemente as transformações advindas da engenharia genética, como os alimentos transgênicos, substâncias alergênicas, resíduos de

medicamentos de uso veterinário e hormônios (OMS, 2002).

Apesar dos riscos inerentes à presença de todos os contaminantes supracitados, a contaminação microbiológica é umas das mais relevantes para a saúde pública, considerando os elevados índices de doenças veiculadas por alimentos (DVAs), provocados por microrganismos patogênicos em todo o mundo (OMS, 2003).

O número de surtos de DVAs ocasionado pelo consumo de frutas e hortaliças *in natura* tem aumentado ao longo dos anos, fato este observado em vários países do mundo, onde este grupo de alimentos tem sido considerado como fonte potencial de microrganismos patogênicos (FDA, 1998; BUCK, WALCOTT & BEUCHAT, 2003).

A maioria dos países que dispõem de sistemas operantes para notificar casos de doenças veiculadas pelos alimentos tem documentado aumentos significativos durante as últimas décadas, e os principais microrganismos implicados são *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* do tipo enterohemorrágica (OMS, 2002).

Todo alimento apresenta uma microbiota natural bastante variável, concentrada principalmente na região superficial (BRENES, 2002). Ao lado desta microbiota natural, os alimentos estão sujeitos à contaminação por diferentes microrganismos, provenientes da atmosfera ambiental, da manipulação, utensílios, equipamentos, dentre outros, conhecidos como fatores extrínsecos (VALSECHI, 2006).

Segundo Janisiewicz et al.(1999), as frutas e os vegetais contêm os nutrientes necessários para o crescimento rápido de bactérias patogênicas. E apesar das barreiras mecânicas, como a casca, que impede a entrada dos microrganismos para o interior destes alimentos, quando estas se encontram com fissuras ou são cortadas, esta barreira é rompida, criando assim uma oportunidade para a colonização bacteriana.

A microbiota presente em vegetais frescos constitui-se basicamente de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* (NASCIMENTO et al., 2005). Entre os gêneros da família *Enterobacteriaceae*, encontra-se a *Escherichia*, sendo a principal espécie a *Escherichia coli*, pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes (FRANCO, 1996).

### 3.2.1 Bactérias do grupo coliforme/ *Escherichia coli*

As bactérias do grupo coliformes compreendem os coliformes totais e termotolerantes; neste grupo se incluem as bactérias em forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, entre 24 a 48 horas a 35°C, os coliformes totais, e em 24 horas a 44,5 °C os coliformes termotolerantes (CUNHA, 2006).

O grupo dos coliformes totais inclui espécies que podem ser originárias do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente e outras não entéricas. Já o grupo dos coliformes termotolerantes inclui bactérias originárias do trato gastrointestinal, o gênero *Escherichia* e outras de origem não fecal, como os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A presença de coliformes termotolerantes nos alimentos pode indicar qualidade higiênico-sanitária insatisfatória dos mesmos, quer seja pela contaminação da matéria-prima e do produto nas fases de processamento ou mesmo quando acabado, podendo inferir também, a respeito da potencial presença de patógenos nestes substratos (AMÂNCIO et al., 2003).

Marques (2003) adverte, porém, que a presença de coliformes termotolerantes em alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal do que a enumeração de *Escherichia coli*, por ser, como já foi citado, uma bactéria predominante da microbiota intestinal.

A *Escherichia coli* distribui-se a partir das fezes, habitat específico e ou primário, alcançando o solo e sendo veiculada principalmente através da água até os vegetais (AMÂNCIO et al., 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a). Esta resolução estabelece planos de amostragem, no qual se define o número de unidades a serem analisadas, bem como o tamanho destas; define os microrganismos que devem ser estudados para cada tipo de alimento e estabelece os padrões, normas e especificações de acordo com outros órgãos internacionais que definirão se o produto será aprovado ou não. Para as hortaliças *in natura*, não sanitizadas, esta legislação estabelece parâmetro apenas para a *Salmonella* spp.,

que é ausência em 25g da amostra. Com relação à presença de bactérias do grupo coliformes, essa Resolução somente apresenta padrões para hortaliças prontas para o consumo.

No Brasil, algumas pesquisas têm sido conduzidas para verificar a qualidade higiênico-sanitária das hortaliças que são ingeridas *in natura*. Dentre os microrganismos pesquisados, os coliformes termotolerantes são frequentemente incluídos. Vários desses estudos demonstram a relevância deste problema, ou seja, a presença desses microrganismos, muitas vezes em altos números, nas amostras estudadas (TAKAYANAGUI et al., 2000; NOGUEIRA, 2002; CABRINI et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2005; PAULA, 2003; SIMÕES et al., 2001; RIBEIRO et al., 2005).

Takayanagui et al. (2000), em Ribeirão Preto - SP analisaram 129 hortas identificando irregularidades em 20,1% delas, destacando-se a elevada concentração de coliformes termotolerantes em 17% das mesmas. Cabrini et al. (2002) avaliando 42 amostras de alface comercializada nos mercados da cidade de Limeira-SP, verificaram que quase 100% das mesmas (41) apresentaram coliformes totais e 17 apresentaram *E. coli*. Simões et al. (2001), em Campinas-SP, também investigaram a presença desse grupo de bactérias em hortaliças e condenaram pela análise bacteriana 22,3% das amostras colhidas em hortas desta cidade. Ribeiro et al. (2005) encontraram números mais elevados no isolamento de coliformes termotolerantes em 60 amostras de alface colhidas em hortas da Ilha de São Luís - MA, ou seja, 83,3% de amostras positivas para o microrganismo.

Apesar de a *Escherichia coli* exercer um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando algumas vitaminas, existem algumas cepas que desenvolveram a habilidade de causar doença. Estas cepas patogênicas de *E. coli* podem ser divididas pelo menos em seis categorias diferentes com esquemas patogênicos distintos (SILVA et al., 2003; NATARO & KAPER, 1998).

Dentre as linhagens de *E. coli* patogênicas as mais estudadas são: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC ou VTEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC) (AMÂNCIO et al., 2003).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) está normalmente associada às diarreias nos países em desenvolvimento e é conhecida também como diarreia do viajante. A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) infectam principalmente crianças

menores de dois anos nos países em desenvolvimento, sendo que a EPEC tem sido reportada como causa importante de diarreia no recém nascido (BALBANI & BUTUGAN, 2001). A *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC) é uma linhagem que se dispõe de poucos dados e sua patogenicidade parece estar relacionada com a adesão à mucosa intestinal, sendo esta diferente das demais cepas, podendo causar diarreia aquosa (LANDGRAF, 1996).

A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC ou VTEC), caracteriza-se pela produção de uma toxina chamada de verotoxina (VT) ou "shiga-like" toxina (ST), similar à produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I, associadas à colite hemorrágica (HC) e à Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) (WEAGANT et al., 1995; FENG, 1995).

O comportamento sorológico da *Escherichia coli* enterohemorrágica é identificado por meio de antissoros preparados contra as três variedades de antígenos que podem estar presente: O, antígeno somático; K, antígeno capsular e H, antígeno flagelar. Existem vários sorovares catalogados, sendo O26: H11 e O157: H7 os mais citados, destacando-se este último como agente etiológico da grande maioria de surtos fora do Brasil (KOBAYASHI, 2001).

Estas cepas diferem das demais cepas de *E.coli* em algumas características, destacando-se a não fermentação do sorbitol, a não produção da enzima  $\beta$ -glicuronidase e o seu crescimento pobre ou nulo a 44°C (MARCH & RATNAM, 1986). A *Escherichia coli* O157: H7 apresenta também a habilidade para se desenvolver em valores de pH próximos a 3 e 4, o que a distingue de outros patógenos e atribui-lhe a característica ácido-resistente (DOYLE, 1989).

A sintomatologia decorrente da doença provocada pela *Escherichia coli* O157: H7 caracteriza-se inicialmente por um quadro severo e súbito de HC, acompanhado posteriormente por diarreia aquosa, sangramento e no caso de pacientes com a imunidade mais baixa, pode evoluir para um grave acometimento renal, a HUS (FDA, 2006a).

A *Escherichia coli* O157 foi isolada pela primeira vez em 1975, nos Estados Unidos, a partir de fezes de doentes que apresentavam diarreia sanguinolenta. Entretanto, o seu reconhecimento como microrganismo responsável pela gênese desta enfermidade só ocorreu na década de 80, associado a um surto ocorrido em estados americanos, após o consumo de hambúrgueres contaminados pela bactéria, oriundos de uma grande rede de "fast-foods" (DOYLE, 1989; TAUXE, 1997).

Na década de 90 ocorreu um surto maior envolvendo 600 pessoas e quatro mortes, provocadas também pelo consumo de hambúrgueres em uma rede de lanchonete, o que contribuiu para aumentar a sua importância como patógeno de veiculação alimentar (BELL, GOLDOFT, GRIFFIN, 1994). A partir daí, as pesquisas demonstraram que o trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas enterohemorrágicas de *E. coli* O157: H7 (TAUXE, 1997).

A transmissão de *E. coli* O157: H7 em surtos e casos de HC e HUS, sempre esteve relacionada principalmente ao consumo de produtos de origem animal, especialmente a carne bovina e seus derivados, leite cru e iogurte (DOYLE, 1989; FDA, 1998). Nos últimos 10 anos, no entanto, verificou-se um aumento significativo no número de surtos associados a outros alimentos além da carne, em particular as frutas, os sucos de frutas, os vegetais e as saladas preparadas com vegetais (FDA, 2006a). Recentemente, o “Food and Drug Administration - FDA” notificou um surto envolvendo 26 estados americanos, onde 183 casos da doença provocada pela *E. coli* O157: H7 foram relatados, incluindo 29 casos com a síndrome urêmica hemolítica (HUS), tendo sido registrada uma morte. O surto foi atribuído ao espinafre consumido cru ou em preparações onde o mesmo era utilizado cru (FDA, 2006c).

Segundo informações do “Centers for Disease Control and Prevention” (FDA, 2006b), são estimados 73.000 casos de infecção por *Escherichia coli* O157: H7 e 61 mortes por ano nos Estados Unidos. A infecção pode ocorrer através do consumo de alimentos contaminados ou pela transmissão da bactéria de uma pessoa para outra devido a hábitos higiênicos inadequados.

No Brasil, de maneira específica, ainda não há relatos de surtos epidêmicos relacionados à *E. coli* O157: H7 (AMÂNCIO et al., 2003).

O Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE/SP, 2002), registrou no período de 1998 a 2000, 15 casos de HUS em hospitais públicos do Estado, com histórico anterior de diarreia e possível associação com *E. coli* O157: H7. Nos casos em que foi feita a coprocultura, a presença de *E. coli* foi detectada, mas o agente não foi isolado e/ou sorotipado para confirmação.

No Rio Grande do Sul, um estudo retrospectivo de casos de HUS ocorridos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, no período de março de 1997 a agosto de 1999, apontou a existência de 31 casos da doença em crianças com idade de dois

a 57 meses (CVE/SP, 2002). Esses relatos confirmam a existência da síndrome hemorrágica urêmica - HUS no país e deixam clara a necessidade de monitoramento dessa bactéria em diferentes produtos e regiões (SILVA et al., 2003).

A dose infectante para a contaminação humana por *Escherichia coli* O157: H7 não é conhecida, porém avaliando-se dados de surtos, incluindo a habilidade do organismo de ser transmitido de pessoa a pessoa, a dose pode ser similar àquela de *Shigella* spp., ou seja, apenas 10 organismos são suficientes para causar a doença (FDA, 2006a).

No período de janeiro de 1997 a outubro de 1999 foi feita uma investigação quanto a ocorrência de *Escherichia coli* O157: H7 em 2.095 amostras de alimentos produzidos no sul e sudeste do Brasil, incluindo 1.111 amostras de produtos cárneos (hambúrguer e lingüiça), 115 amostras do ambiente industrial (frigoríficos) e 869 amostras de vegetais (alface, chicória e rúcula), porém não foi detectada a presença do patógeno em nenhuma das amostras analisadas (SILVA et al., 2003).

### **3.2.2 *Salmonella* spp.**

A *Salmonella* é outro gênero de grande relevância como patógeno alimentar pertencente à família Enterobacteriaceae; são bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, produzem gás a partir da glicose (exceto *Salmonella* Typhi), são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, sendo a maioria móvel (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O principal reservatório desta bactéria é o trato gastrointestinal do homem e de animais, principalmente aves e suínos. Este gênero abriga as espécies causadoras de febre tifóide (*Salmonella* Typhi), febres entéricas (*Salmonella* Paratyphi A, B, C) e das enterocolites que genericamente se enquadram no grupo das doenças designadas por salmoneloses (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Pesquisas têm demonstrado que a *Salmonella* pode sobreviver por até 87 dias em água de abastecimento público, 115 dias em solo de jardim, acima de 30 meses em esterco bovino seco e 28 meses em fezes de aves infectadas (FARIAS, 2000).

A dose infectante do microrganismo pode variar entre 15 a 20 células a depender da



idade e da imunidade da pessoa infectada e do tipo de cepa envolvida (FDA, 2006c). Estima-se de dois a quatro milhões de casos de salmoneloses nos Estados Unidos anualmente, sendo os sorotipos mais comuns o Typhimurium e o Enteritidis (CDC, 2005; FDA, 2006d,2006e).

No Brasil o sorotipo de *Salmonella* mais freqüentemente isolado de casos de infecções humanas e também de materiais de origem não humana, principalmente alimentos, é a *Salmonella* Enteritidis (BRASIL, 2002).

Levantamento realizado entre os anos de 1991 a 1995, pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, com 2.254 linhagens isoladas de casos de infecções humanas e 3.236 de materiais de origem não humana, evidenciou um aumento significativo na participação da *S. Enteritidis*, ou seja, um incremento de 1,2% para 64,9% entre as amostras humanas e de zero para 40,7% para as amostras não humanas, com expressivo aumento a partir de 1993, particularmente em ovos, aves (matrizes) e amostras do meio ambiente (TAVECHIO et al., 1996).

Apesar da principal fonte de transmissão de *Salmonella* ser os alimentos de origem animal, vários estudos realizados com produtos de origem vegetal detectaram a presença da bactéria nos mesmos. Takayanagui et al. (2000), em Ribeirão Preto, SP, analisaram hortaliças provenientes de 129 hortas, encontrando a presença de *Salmonella* spp. em 3,1% das mesmas. Bruno et al. (2005) também estudando vegetais minimamente processados, detectaram a presença de *Salmonella* spp. em 66,6% das amostras de hortaliças e tubérculos e em 26% das frutas investigadas. Palú et al. (2002) encontraram *Salmonella* spp. em cinco (16,6%) das 30 amostras analisadas de vegetais crus (frutas e hortaliças), comercializadas em restaurantes do Rio de Janeiro, RJ. Sousa et al. (2002) investigaram a presença do microrganismo em sucos e néctares de frutas comercializados por uma indústria em Belém-PA, e encontraram positividade em 4,2 % das amostras analisadas.

Embora os sorotipos mais isolados no Brasil pertençam à *Salmonella* Enteritidis, a febre tifóide provocada pela *Salmonella* Typhi também é uma preocupação atual, pois se trata de uma doença de distribuição mundial associada à situação precária de saneamento básico, higiene pessoal e ambiental. Transmitida principalmente através da ingestão de água ou de alimentos contaminados com fezes humanas ou com urina. Ocorre no Brasil de forma endêmica, com algumas epidemias onde as condições são mais precárias (BRASIL, 2006a).

### **3.3 Práticas agrícolas: Condições higiênicas sanitárias dos locais de produção, insumos e manipuladores.**

Pelo fato das hortaliças serem produzidas sob diferentes condições climáticas, estruturais e utilizando-se práticas agrícolas diversas, pressupõe-se que os perigos microbiológicos variem entre estes sistemas. Portanto, todos os procedimentos devem ser conduzidos sob condições higiênicas e estruturais satisfatórias, visando minimizar os riscos potenciais a saúde do consumidor (FDA, 1998).

Os riscos microbianos que afetam a segurança dos alimentos podem estar presentes em qualquer ponto da cadeia produtiva, desde o cultivo, colheita, lavagem, armazenamento, transporte, comercialização e finalmente na mesa do consumidor (RANTHUM, 2002).

Durante o cultivo, as fontes potenciais de contaminação devem ser identificadas. Frequentemente observam-se irregularidades com a água utilizada, o adubo, saneamento básico, a presença de animais nos locais de produção, além de outras deficiências na infraestrutura dos locais de produção e manejo agrícola (MORETTI, 2003).

A produção agrícola de hortaliças provoca um desgaste muito grande da matéria orgânica do solo, pelo uso intensivo da mesma área (BRASIL, 1999). Dessa forma, visando aumentar a produtividade e melhorar o cultivo, os agricultores optam muitas vezes pelo uso de adubos orgânicos, como por exemplo, o esterco animal, pelo baixo custo e pela sua eficácia como fertilizante (EMBRAPA, 2001b). Essa fonte de adubo indevidamente tratada pode conter patógenos e contaminar as hortaliças, como por exemplo, a *Escherichia coli* 0157: H7, que pode sobreviver por até 70 dias nas fezes destes animais (TAUXE, 1997).

Culturas rentes ao solo, como algumas hortaliças folhosas, são mais vulneráveis a patógenos que podem sobreviver no solo, ou serem borrifadas com terras contaminadas durante a irrigação ou chuvas fortes (FDA, 1998). Terras que foram usadas para outras atividades, como solos que anteriormente serviram como depósitos de lixo, podem apresentar contaminação por bactérias patogênicas, pois contém matéria orgânica em decomposição e possivelmente material fecal (EMBRAPA, 2001a).

A área de cultivo quando situada em regiões íngremes favorece o escoamento de águas superficiais contaminadas, situação essa que se agrava com a presença de residências próximas a este local que não dispõem de drenagem adequada para as águas servidas (LEITE,

2000). Acresce a isso a presença de animais circulando nas hortas ou em áreas próximas, pois suas fezes constituem uma fonte de patógenos que podem contaminar as hortaliças (MORETI, 2003).

Outros fatores como a inexistência de instalações sanitárias adequadas para os trabalhadores ligados ao cultivo e colheita das hortaliças implica em má administração dos dejetos humanos, podendo aumentar bastante o risco de contaminação da lavoura (LEITE, 2000).

De acordo com Silva Jr. (2001), a saúde e a higiene pessoal dos trabalhadores que entram em contato direto com os alimentos devem ser monitoradas. Funcionários que apresentam algum tipo de moléstia, como ferimentos na pele infeccionados, diarreia, gripe e vômito, podem veicular microrganismos para os alimentos, devendo, portanto, serem encaminhados para avaliação médica e se necessário afastados de suas atividades.

### **3.4 Água de irrigação**

A água está se tornando, cada vez mais um bem escasso e sua qualidade vem se deteriorando muito rapidamente (OPAS, 2001). Em razão do crescimento natural da população e dos altos índices de contaminação das fontes de água, a oferta deste produto de boa qualidade, principalmente em áreas urbanas constitui um grande desafio (FILIZOLA et al., 2002).

De acordo com o relatório “Situação Global de Suprimento de Água e Saneamento” do ano 2000, da Organização Pan-americana de Saúde, 2,4 bilhões de pessoas não vivem em condições aceitáveis de saneamento, enquanto 1,1 bilhões de pessoas não têm acesso a um adequado abastecimento de água (OPAS, 2001).

A água utilizada na lavoura envolve diversas operações, tais como: irrigação, aplicação de pesticidas, fertilizantes e lavagem das hortaliças (MORETTI, 2003). O principal objetivo da irrigação consiste em fornecer água às culturas de forma eficiente. Para satisfazer a esta demanda cerca de 70% do consumo hídrico do mundo destina-se a esta finalidade (GINESTE, 2004). A agricultura irrigada, em muitas situações, é a única maneira de se garantir a produção de alimentos, em bases sustentáveis e com segurança, mesmo em períodos de escassez de chuvas (AMORIM, 2003).

Os recursos hídricos utilizados para a irrigação, encontram-se segundo Oliveira et al. (2001), na sua grande maioria, a partir de águas provenientes de rios, córregos e lagos adjacentes às plantações, sem nenhum tratamento prévio, podendo esta ser uma fonte potencial de contaminação. Este problema torna-se ainda mais grave nos cinturões verdes dos grandes centros urbanos, onde quase toda a água superficial está severamente contaminada por efluentes municipais não tratados (MAROUELLI & SILVA, 1998).

De acordo com alguns pesquisadores, a contaminação microbiológica das hortaliças durante o seu cultivo ocorre principalmente devido à irrigação com água contaminada ou quando se utiliza adubo como dejetos humanos (FDA, 1998; OLIVEIRA & GERMANO, 1992; SILVA et al., 2005).

Os principais fatores que contribuem para contaminação microbiana destas águas são as condições ecológicas em que se encontram as fontes de água, tais como: proximidade com áreas domésticas, poluentes do tipo lixão, currais, canais, esgotos, fossas, presença de adubo orgânico próximo às fontes, declive acentuado do solo, presença de animais, poços artesianos com as instalações precárias e utilização de água proveniente de rios e riachos contaminados (OLIVEIRA et al., 2001).

As águas residuárias domésticas, quando utilizadas sem tratamento adequado, podem contaminar o ambiente por concentrarem bactérias, parasitas e vírus que geram graves problemas de saúde pública, uma vez que propagam enfermidades de veiculação hídrica, que podem afetar não só os trabalhadores, mas também, os prováveis consumidores das culturas irrigadas (SOUSA et al., 2006).

No planejamento de irrigação todas as medidas devem ser tomadas para reduzir a demanda de água potável para este fim, optando-se por vias alternativas, incluindo o reuso de águas servidas. No entanto, as mesmas devem ser tratadas antes de serem utilizadas, medida que nem sempre ocorre (SOUSA et al., 2006).

### **3.4.1 Qualidade microbiológica e doenças veiculadas pela água de irrigação**

O transporte de microrganismos patogênicos pela água representa um fator importante no comprometimento dos recursos hídricos e na disseminação de processos infecciosos, em

especial quando sistemas de abastecimento de água e tratamento de esgotos são precários (RIVERA & MARTINS, 1996).

Os principais agentes biológicos encontrados nas águas contaminadas são as bactérias, os vírus e os parasitos (OMS, 2000). As doenças de veiculação hídrica são causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidas basicamente pela rota fecal-oral, ou seja, os microrganismos são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento contaminado por água poluída com fezes (AMARAL et al., 2003).

Nos países em desenvolvimento, em consequência das precárias condições de saneamento e da má qualidade das águas, as doenças de veiculação hídrica, como a febre tifóide, cólera, salmonelose, hepatite A e verminoses, têm sido responsáveis por diversos surtos e elevadas taxas de mortalidade infantil. Nesses países, as doenças diarréicas acometem em torno de 1,5 bilhões de crianças com até cinco anos de idade a cada ano (OMS, 2000).

Várias agentes patogênicos podem estar presentes em fontes de água ou em águas residuárias, sendo que os principais envolvidos em surtos são: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, dentre outros (OMS, 2003; MORETTI, 2003). Dessa forma, sempre que a água permanecer em contato com produtos agrícolas frescos, sua qualidade poderá influenciar diretamente no potencial de contaminação destes produtos (EMBRAPA, 2001a), especialmente quando a parte comestível do alimento é exposta em contato direto com a água contaminada, ou quando a irrigação é realizada próxima ao horário de colheita (FDA, 2001).

Segundo, Steele & Odumeru (2004), o risco da transmissão de doenças causadas por microrganismos patogênicos presentes na água de irrigação é influenciado pelo nível de contaminação das mesmas, pela persistência do patógeno na água, no solo, na colheita e de acordo com a rota da exposição.

As técnicas de isolamento e identificação dos microrganismos patogênicos a partir da água são complexas, onerosas e a obtenção dos resultados demanda muito tempo, por isto ao invés de verificar a presença de agentes patogênicos, pesquisa-se a presença de microrganismos indicadores de poluição fecal, representado pelos coliformes termotolerantes (MARQUES, 2003).

A presença de coliformes totais nos alimentos não indica, portanto, a contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos, sendo assim, a enumeração de coliformes totais em água é menos representativa como indicação de contaminação fecal comparada à coliformes termotolerantes (LANDGRAF, 1996).

O padrão microbiológico para a água de irrigação, vigente no Brasil, foi regulamentado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução no. 357 de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005). Esta normativa estabelece a classificação das águas com base nos usos preponderantes, estabelecendo níveis de qualidade a ser alcançado e ou mantidos. Assim a água destinada à irrigação de hortaliças consumidas cruas, recebe a classificação de “Especial, tipo1”, não devendo exceder um limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais, em pelo menos seis amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral.

Vários estudos têm demonstrado a contaminação da água de irrigação em hortas no Brasil. Leite (2000) verificou através da análise microbiológica a presença de bactérias do grupo coliformes totais em 93,5% das águas e coliformes fecais em 65,2% delas. Nogueira (2003), em estudo com hortas no município de Jaboticabal, SP, encontrou 22,9% de coliformes fecais na água de irrigação no período chuvoso e 23,5% em período sem chuva.

Marques (2002), em Goiânia – Go encontrou em seu estudo 93,2% de contaminação por coliformes termotolerantes e 86,41% de *Escherichia coli* na água de irrigação de hortaliças.

Farache Filho et al. (2001) verificaram que entre as 47 hortas pesquisadas, 40,4% tiveram pelo menos uma das amostras de água acima do padrão brasileiro vigente. Solomon et al. (2002), estudando a transmissão de *Escherichia coli* O157: H7 às plantas através de dois sistemas diferentes de irrigação, demonstraram a possibilidade de contaminação em ambos, sendo que em um deles (sistema de pulverização), um percentual significativo das culturas permaneceu com a bactéria até 20 dias após a irrigação. Os resultados deste estudo sugerem

que não obstante o método da irrigação usado, as colheitas podem se tornar contaminadas.

### **3.5 Considerações sobre o controle sanitário na produção de hortaliças e doenças veiculadas por alimentos**

Um alimento pode apresentar risco à saúde por razões como: contaminação ou crescimento microbiano; uso inadequado de aditivos químicos; adição acidental de produtos químicos; poluição ambiental ou degradação de nutrientes. Há um consenso geral de que o problema mais importante do ponto de vista de saúde pública é a ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A deficiência no controle da qualidade sanitária em qualquer uma das etapas da cadeia alimentar, durante o cultivo, colheita, armazenamento, transporte e comercialização é um fator predisponente à ocorrência de casos ou surtos de doença veiculada por alimento (DVA) (BRASIL, 2002).

A identificação dos riscos inerentes a um processo produtivo constitui ferramenta valiosa para reconhecer as ações preventivas que possam ser implementadas (COSTA, 1999). Entretanto, o desenvolvimento de estratégias para reduzir os riscos relacionados com a alimentação, requer o conhecimento prévio de dados sobre as DVAs do local, para evidenciar o problema à saúde pública e facilitar o desenvolvimento de ações baseado nos riscos que aquele alimento oferece (OMS, 2002).

As últimas notificações de doenças transmitidas por alimentos, no mundo, indicam o surgimento de um novo cenário epidemiológico, caracterizado principalmente pela rapidez de propagação, alta patogenicidade e caráter cosmopolita dos agentes patogênicos, com especial destaque aos infecciosos, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (LOPES, 2005).

A evolução da dinâmica das DVAs, incluindo o surgimento dos novos patógenos acima referidos, a globalização da economia e o intercâmbio internacional, aumentam o risco de contaminação dos alimentos (LOPES, 2005). Há de se considerar também o crescente aumento da população implicando na necessidade de produção em grande escala de alimentos, o aumento no consumo de “fast-foods”, processos de urbanização desordenados, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos devido ao aumento da expectativa de vida através do consumo de novas drogas e diagnósticos mais precoces, e o

deficiente controle dos órgãos públicos e privados (BRASIL, 2006b).

Outro fator contribuinte para o aumento das DVAs está relacionado a mudança de hábitos alimentares, especificamente o aumento no consumo de vegetais frescos, frutas e verduras sem a adequada higienização (BRASIL, 2006b; BUCK et al., 2003 ).

A vigilância das DVAs é fundamental para o fornecimento de alimentos inócuos, pois serve como eixo para direcionar as ações mais prioritárias, avaliar os programas preventivos e de controle implementados, auxiliando também na identificação de questões que podem surgir relacionadas à inocuidade dos alimentos (OMS, 2004).

Na maioria das vezes, em função da ausência de sistemas de vigilância sanitária ou debilidade dos programas de controle das DVAs, principalmente nos países em desenvolvimento, as informações mundiais existentes não representam a magnitude do problema, estimando-se uma incidência de 10% nos países com sistemas de informação mais eficientes e apenas 1% nos demais países com sistemas incipientes, como é o caso do Brasil (RANTHUM, 2002).

O perfil epidemiológico das DVAs no Brasil é pouco conhecido, somente alguns estados dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (BRASIL, 2002).

O Art. 6º, Parágrafo 1 da Lei Federal nº 8.080 de 19/09/1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, define a Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos a saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Esta atribuição da vigilância sanitária lhe confere um papel fundamental para que os alimentos oferecidos à população sejam seguros e com qualidade (BRASIL, 1990).

Contudo, segundo Silva (1998), a ocorrência de doenças infecciosas transmitidas por alimentos pode ser vista como falha na implantação das medidas de inspeção e controle vigentes no país.



### 3.6 Sanitização de hortaliças

O risco de toxinfecções humanas por patógenos de origem alimentar, pode ser reduzido prevenindo-se a contaminação dos alimentos, controlando o crescimento dos microrganismos patogênicos, removendo-os ou diminuindo-os através das lavagens e uso de sanitizantes (BEUCHAT, 2004).

De acordo com o FDA (1988), a prevenção da contaminação das hortaliças é preferível à aplicação de agentes químicos antimicrobianos, porém isto nem sempre é alcançado, devido à existência de falhas no controle das etapas que antecedem o consumo . Segundo Silva Jr. (2001), a higienização dos alimentos se caracteriza principalmente, pelos processos através dos quais os alimentos se tornam higienicamente e sanitariamente adequados para o consumo, utilizando-se várias técnicas de processamento, dentre estas os produtos para limpeza e desinfecção dos alimentos.

A lavagem em água corrente de boa qualidade pode reduzir em até 74% a carga microbiana dos vegetais (LEITÃO et al., 1981), porém, não é suficiente para manter a contaminação em níveis seguros, sendo essencial à aplicação de uma etapa de desinfecção com agentes antimicrobianos (LEITÃO et al., 1981, TAKEUSHI & FRANK, 2001).

De acordo com o estudo realizado por NASCIMENTO (2002), após a lavagem de hortaliças em água corrente, as mesmas permaneceram com altos índices de contaminação, atribuídas às etapas de produção, transporte e comercialização. Concluindo desta forma, que apenas a lavagem em água corrente não foi suficiente para diminuir a carga microbiana a níveis seguros.

No entanto, Leitão et al. (1981), ressaltam que a pré-lavagem em água corrente é um requisito essencial para retirada da matéria orgânica na superfície das hortaliças, diminuindo assim a inativação dos sanitizantes químicos utilizados posteriormente na etapa da sanitização. Para Brenes (2002), os agentes sanitizantes são substâncias químicas que podem destruir ou reduzir substancialmente a população de microrganismos presentes na água de lavagem e resfriamento, reduzindo a contaminação cruzada, como também podem reduzir, mas não eliminar os patógenos da superfície dos produtos.

A eficácia dos sanitizantes em produtos de origem vegetal é frequentemente questionada, em parte atribuída à inacessibilidade dos sanitizantes na estrutura interna ou nos

tecidos destes vegetais, que podem abrigar patógenos (TAPIA DE DAZA & DIAZ, 1994). Burnett & Beuchat (2000), destacam a presença da cutícula hidrofóbica dos vegetais, as superfícies morfológicas diferentes e as abrasões na epiderme dos vegetais, como fatores limitantes para a eficácia dos sanitizantes. Outro fator importante são as práticas de manipulação durante o processo de sanitização dos alimentos, pois quando realizadas inadequadamente, podem significar uma fonte potencial de contaminação (FDA, 1988; LUENGO & LANA, 2007).

De acordo com Santana et al. (2002) a sanitização de vegetais, sob o ponto de vista de segurança alimentar, é considerada etapa crítica do processamento, assim também como os aspectos de higiene pessoal na manipulação do produto. Estatísticas de países industrializados revelam que 60% das intoxicações alimentares são atribuídas à manipulação incorreta de alimentos, sugerindo um índice ainda mais elevado para os países em desenvolvimento, em função das precárias condições de infra-estrutura e educação dos seus habitantes (NASCIMENTO et al., 2002).

### **3.6.1 Agentes sanitizantes e a sua eficiência na eliminação de patógenos**

A lavagem dos vegetais é a prática mais comum para se obter um produto mais seguro, entretanto, a eficácia da operação de lavagem pode ser aumentada acrescentando soluções sanitizantes, objetivando a redução e ou eliminação de microrganismos presentes nestes alimentos (BERBARI et al., 2001).

A atividade germicida de sanitizantes utilizados na indústria de alimentos depende de vários fatores, entre estes: concentração, tempo, temperatura, pH, solubilidade, concentração de matéria orgânica, tipo de superfície e espécie e população do microrganismo que se quer destruir (BEUCHAT et al., 2001; BRENES, 2002).

Segundo a “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1995), um sanitizante para ser considerado eficaz deverá reduzir 99,999%, ou seja, cinco ciclos logarítmicos, da população microbiana inicial. Vários agentes sanitizantes vêm sendo utilizados na higienização de frutas e hortaliças, sendo os mais comumente utilizados aqueles à base de cloro (BRENES, 2002). Porém, segundo Beuchat et al. (1988), o cloro utilizado nas concentrações recomendadas ( $<300 \text{ mg L}^{-1}$ ) para evitar as alterações sensoriais, normalmente

não elimina mais do que dois ciclos logarítmicos da microbiota de frutas e vegetais.

No estudo conduzido por Nascimento et al. (2003), foi realizada uma avaliação comparativa da eficiência do hipoclorito de sódio a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , dicloroisocianurato de sódio a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , ácido acético 2,0% e 4,0%, ácido peracético  $80 \text{ mg L}^{-1}$  e vinagre 6,0%, 25,0% e 50,0% na sanitização de uva. A análise estatística dos resultados demonstrou que todos os sanitizantes testados apresentaram eficiência semelhante ou superior ao hipoclorito de sódio.

Fantuzzi et al. (2004) observaram que após a sanitização do repolho por 10 minutos, à temperatura ambiente, em soluções sanitizantes de hipoclorito de sódio a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , composto orgânico clorado a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  ou ácido acético a 1%, a redução de microrganismos aeróbios mesófilos foi de no máximo  $1,8 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ . Takeuchi & Frank (2001) avaliaram o efeito do hipoclorito de sódio ( $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro residual livre/ 5 min/  $22^{\circ}\text{C}$ ) sobre *E.coli* O157: H7 inoculada na superfície intacta e em cortes de folhas de alface, observando 0,3 e 0,4 reduções decimais, respectivamente.

Segundo alguns pesquisadores, em adição ao limitado efeito da lavagem com hipoclorito, o sistema pode produzir substâncias carcinogênicas como trihalometanos, (FERRARIS et al., 2005; DUNNICK & MELNICK, 1993). Tais substâncias são denominadas subprodutos da cloração, originárias das reações entre o cloro e as substâncias orgânicas presentes na água, os ácidos húmico e fúlvico (MACEDO et al., 2001).

Há, portanto, um grande interesse em desenvolver sanitizantes alternativos para a lavagem de vegetais e frutas, por parte das indústrias de alimentos, que sejam mais eficazes que o hipoclorito para reduzir ou eliminar patógenos em produtos frescos, e que não possuam efeitos deletérios ao organismo humano (NASCIMENTO et al., 2003).

Neste aspecto destacam-se os ácidos orgânicos de cadeia curta, que embora não sejam considerados sanitizantes, têm sido muito utilizados em estudos de redução de população bacteriana em alimentos (FDA, 2001; NASCIMENTO et al., 2003).

Os ácidos orgânicos de cadeia curta são produzidos a partir do metabolismo natural das frutas e hortaliças, entre estes se destacam: os ácidos acético, benzóico, cítrico, málico, sórbico, succínico e tartárico (FDA, 2001). Os mesmos proporcionam uma proteção natural contra a proliferação de patógenos bacterianos, visto que, a maioria destes microrganismos não pode se desenvolver a um pH inferior a quatro, embora alguns tipos possam adaptar-se a

este pH e provocar enfermidades (BRENES, 2002).

A eficácia dos ácidos orgânicos como sanitizantes ou antimicrobianos varia amplamente com o tipo de ácido empregado e com a célula bacteriana presente (BRENES, 2002). São compostos 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 dos ácidos orgânicos pode ser classificada em duas categorias: ação bacteriostática, inibição do crescimento bacteriano e ação bactericida, que seria a redução do número de células viáveis (BJORNSDOTTIR, 2005).

O vinagre e o suco de limão contendo os ácidos acético e cítrico, respectivamente, são usados como flavorizantes e acidificantes para saladas de vegetais e podem ser considerados como sanitizantes alternativos para remover ou pelo menos reduzir a carga de patógenos, não causando risco à saúde dos consumidores (SEGUN & KARAPINAR, 2004). Essas substâncias são geralmente reconhecidas como seguras ou “General Recognized as Safe” (GRAS) pelo Código Federal de Regulamentações dos Estados Unidos. No Brasil, o ácido láctico e o ácido peracético têm seu uso aprovado como sanitizantes para ovos, carcaças e partes de animais de açougue, através das Resoluções RDC nº 7 de 02 de janeiro de 2001 e RDC nº 02 de 08 de janeiro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, respectivamente (BRASIL, 2001a, BRASIL, 2004). Porém em outros países, o vinagre e o ácido acético podem ser utilizados. Esses produtos ganharam aceitação no comércio internacional tanto em função das controvérsias da toxicidade do cloro em alimentos, como também por serem considerados tão eficazes e seguros quanto o cloro (NASCIMENTO, 2002).

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos de cadeia curta vem sendo estudada por vários pesquisadores. Silva et al. (2001), avaliaram a sanitização de carcaças de frango com soluções de ácidos orgânicos comerciais e suco de limão, e concluíram que todos os tratamentos foram eficientes na redução da contaminação inicial, com destaque para o ácido acético que eliminou cepas de *Salmonella* spp. Castillo & Escartin (1994), avaliaram a sobrevivência do *Campylobacter jejuni* em mamão e em melancia após a aplicação do suco

do limão à superfície de cubos inoculados das frutas, e observaram redução significativa nas contagens desta bactéria durante o armazenamento das frutas.

Segun & Karapinar (2004) avaliaram a eficácia do suco de limão, vinagre e a mistura de limão com vinagre na eliminação de *Salmonella* Typhimurium inoculada artificialmente em rúcula e cebola, conseguindo reduções significativas, principalmente na mistura do vinagre com o limão. Vijayakumar & Hall (2002), avaliando o efeito bacteriostático e bactericida da concentração mínima de sanitizantes, incluindo o vinagre e suco de limão, contra cepas de *Escherichia coli* em caldo tripticaseína de soja (TSB), demonstraram que estes sanitizantes em concentrações relativamente baixas apresentavam atividade bactericida contra as cepas testadas.

Eiroa & Porto (1995), avaliaram o efeito bactericida de diferentes desinfetantes a base de cloro e vinagre contra linhagens de *Vibrio cholerae* inoculados em alface e concluíram que o vinagre foi o melhor dos produtos avaliados, seguido em ordem decrescente de eficiência pelos compostos à base de dicloroisocianurato de sódio e hipoclorito de sódio.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Alimentos**

Alface crespa (*Lactuca sativa*), couve (*Brassica oleracea*), coentro (*Coriandrum sativum*) e hortelã (*Mentha villosa*).

#### **4.1.2 Cepas dos microrganismos de referência**

*Escherichia coli* 0157: H7, *Escherichia coli* ATCC 23229, *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi.

#### **4.1.3 Soluções de tratamento**

Vinagre de álcool (Marca Minhoto); Limão, variedade Taiti

#### **4.1.4 Formulário estruturado tipo check-list**

#### **4.1.5 Meios de cultura e reagentes**

Caldo Trypticase de Soja (TSB) (OXOID),

Caldo Tetracionato (MERCK)

Caldo Rappaport (MERCK)

Caldo Lauril Sulfato Triptose (MERCK),

Caldo EC (MERCK)

Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante a 2% (MERCK)

Brain Heart Infusion Broth (BHI) (DIFCO)

Ágar entérico Hektoen ( HE) (MERCK)

Ágar *Salmonella Shigella* (SS) (MERCK)

Ágar Verde Brilhante (MERCK)

Ágar Tryptic Soy (TSA) (OXOID)

Meio SIM (DIFCO)

Ágar Eozina Azul de Metileno (EMB) (DIFCO)

Ágar MacConkey sorbitol (HIMEDIA), adicionado de 0,05mg/L de Cefixina

Agar Triple Sugar Iron (TSI) (DIFCO)

Ágar Lisina-ferro (LIA) (DIFCO)

Caldo VM-VP (Vermelho de metila/Voges Proskauer) (DIFCO)

Ágar Uréia (DIFCO)

Agar Citrato de Simmons (DIFCO)

Água Peptonada Tamponada (DIFCO)

Tampão Fosfato de Butterfield (DIFCO)

Solução alcoólica de alfa-naftol

Hidróxido de potássio a 40%

Reagente de Kovacs (MERCK)

Reagente Vermelho de Metila

Hidróxido de sódio 0,1 N

Fenolftaleína 1%

Água Peptonada a 0,1%

#### 4.1.6 Equipamentos

Balança semi-analítica – Marca: SANTER RC 2022

Autoclave vertical – Marca FANEM

Autoclave vertical - Marca FABBE, modelo 106751

Estufa de incubação tipo BOD – Marca: NOVA ÉTICA, modelo NT 515

Banho-maria circulante – Marca: FANEM, modelo 146

Incubadora Digital tipo “shaker” – Marca INOVA, modelo 4080

Câmara de fluxo laminar – Marca: TROX TECHNICK

Cabine de fluxo laminar - Marca: TROX, modelo classe biológica II

Homogeneizador de amostras – Marca: NOVA ÉTICA

Balança semi-analítica – Marca: MARTE, modelo 200

Balança analítica - Marca METTLE H15

Contador de colônias – Marca PHOENIX, modelo EC 550<sup>a</sup>

Agitador mecânico de tubos – Marca PHOENIX, modelo AP 56

Estufa bacteriológica – Marca FANEM, modelo 002 CB

Potenciômetro – Marca: ANALYSER, modelo 300 M

Câmara científica – Marca: INDREL RC 1500 D

E demais equipamentos comuns em laboratório de microbiologia.



## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Local do estudo**

Foi utilizado como local de estudo hortas comerciais, particulares, situadas na cidade de Salvador-Ba, no Distrito Sanitário Cabula Beiru (DSCB). O DSCB localiza-se na região central da cidade, correspondendo a uma área de 25,3 km<sup>2</sup>, com uma população estimada em 385.109 habitantes (Bahia, 2006).

### **4.2.2 Desenho do estudo**

Este estudo foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa, foi realizado um estudo transversal de caráter descritivo, onde foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias das hortas e realizada investigação da qualidade higiênico-sanitária das hortaliças e água de irrigação. Na segunda etapa, foi feito um estudo experimental, onde avaliou-se a ação do vinagre de álcool, suco de limão, mistura suco de limão e vinagre (1:1) e mistura suco de limão, vinagre e água (1:1: 1), sobre cepas de *Escherichia coli* inoculadas artificialmente em folhas de alface cortadas.

### **4.2.3 Cadastramento e caracterização higiênico-sanitária das hortas**

Para o cadastramento das hortas, foi aplicada a metodologia de busca ativa e informações prestadas pelas unidades de saúde situadas no DSCB. Buscou-se através da aplicação de um formulário semi-estruturado (“check-list”), investigar as condições higiênico-sanitárias dos locais de produção das hortaliças, objetivando detectar a presença de fatores de riscos relacionados ao ambiente de produção (presença de focos de insalubridade, origem da água de irrigação, tipo de adubo, topografia do terreno, saúde e hábitos higiênico-sanitário dos trabalhadores), Este formulário foi adaptado dos modelos propostos pela Divisão de Vigilância Sanitária da Bahia destinados à inspeção em estabelecimentos da área de alimentos (BAHIA, 1996), e também de um “check-list” destinado ao Clube dos Produtores – Relatório de Vistorias da cidade de Porto Alegre - RS (SONAE DISTRIBUIÇÃO BRASIL S.A., 2005). Na aplicação desse formulário foram atribuídas notas a cada item investigado e, de acordo

com a pontuação final obtida, a horta era classificada: excelente (9,0 a 10,0); boa (7,0 a 8,9); regular (5,0 a 6,9); ruim (3,0 a 4,9) e péssima (0,0 a 2,9).

•**Amostragem**

a. Critérios para a seleção das hortas:

- Hortas com fins comerciais;
- Volume da produção de hortaliças.

b. Critérios de inclusão:

- Hortas produtoras de alface, couve, coentro e hortelã;
- Hortas com maior volume de produção.

c. Critérios de exclusão:

- Hortas não produtoras das hortaliças selecionadas;
- Hortas com pequena produção.

d- Tamanho da amostra

Atendendo aos critérios acima, foram cadastradas 10 hortas e destas cinco (50%) foram selecionadas para o estudo.

#### **4.2.4 Investigação da qualidade higiênico-sanitária das hortaliças e água de irrigação**

•**Amostragem**

a. Critérios para seleção das hortaliças:

As variedades de hortaliças para o estudo foram escolhidas levando-se em consideração os seguintes fatores:

- 1) A forma de consumo, geralmente ingeridas cruas;
- 2) O freqüente consumo por parte da população;

3) A disponibilidade durante, praticamente, todos os meses do ano;

4) Hortaliças que permanecem em contato direto com o solo, cujas folhas constituem a parte comestível e que, por sua estrutura física, oferece condições para retenção e sobrevivência de microrganismos nelas depositadas.

Dessa forma, as hortaliças selecionadas foram: alface, coentro, couve e hortelã.

b. Tamanho da amostra

### **Hortaliças**

Foi coletado um total de 140 amostras das hortaliças selecionadas. Essas coletas foram feitas em dias distintos, sendo que cada horta foi visitada por no mínimo cinco vezes, e a cada visita coletava-se quatro amostras das diferentes hortaliças. Estabeleceu-se, como unidade amostral para as alfaces, o pé (ou touceira), independentemente do peso ou tamanho que apresentassem. Para a couve, hortelã e coentro, considerou-se o maço, constituído de folhas agrupadas com peso aproximado de 200g. O tamanho da amostra foi baseado no plano de amostragem proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através do Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) no.12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a). Cada horta estudada foi considerada como um lote, visto que as mesmas condições de cultivo eram aplicadas.

### **Água de irrigação**

Em cada horta foram coletadas 10 amostras da água de irrigação para análise, exceto em uma das hortas que só foi possível coletar cinco amostras, totalizando-se 45 amostras. As coletas da água de irrigação foram realizadas concomitantemente com as das hortaliças, sendo duas amostras por cada visita.

### **•Coleta das amostras**

### **Hortaliças**

A coleta das hortaliças foi feita de forma aleatória, procurando-se pontos equidistantes da horta para se ter uma melhor representatividade.

Com o auxílio de uma faca previamente esterilizada, as amostras foram coletadas utilizando-se sacos plásticos individuais de 1º uso para coleta e acondicionamento das mesmas. No momento da coleta as mãos dos manipuladores foram protegidas por sacos plásticos de 1º uso, evitando-se o contato direto com a amostra, de acordo com a técnica preconizada por Messer et al. (1992). Após a coleta, as amostras foram imediatamente transportadas para o laboratório em caixas de isopor contendo gelo reciclável, e submetidas às análises pertinentes.

### **Água de irrigação**

As amostras foram retiradas de pontos diferentes e de acordo com a disponibilidade de cada horta, sendo assim os pontos de escolha ficaram distribuídos entre: diretamente das fontes (cisternas, riachos, torneira e minadouros) e durante a irrigação através das mangueiras utilizadas. Para a coleta das amostras utilizaram-se sacos estéreis, específicos para este fim e acrescentado de tiosulfato de sódio (0,5%) quando se tratava de água potável. No momento da coleta as mãos dos manipuladores foram protegidas por sacos plásticos de 1º uso, evitando-se o contato direto com a amostra (MESSER et al., 1992). As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo reciclável e transportadas imediatamente para o laboratório para proceder às análises pertinentes.

### **• Análises microbiológicas**

#### **Hortalças**

Ao chegar ao laboratório foram removidas as folhas externas das hortalças e selecionadas aquelas situadas na parte interna para proceder às análises microbiológicas.

#### **▪ Investigação da presença de *Salmonella* spp.**

A investigação da presença de *Salmonella* spp. foi baseada na metodologia preconizada por Flowers et al. (1992), modificado por Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS), procedendo-se o pré-enriquecimento em água peptonada tamponada 0,1% (35°C por 24h), enriquecimento em caldo tetracionato (35°C por 24h), caldo Rappaport, (42°C por 24h) e isolamento em ágar entérico Hektoen (HE), ágar *Samonella-Shiguella* (SS) e ágar Verde Brillhante (BG), incubados a 35°C por 24h. As colônias características foram

confirmadas preliminarmente pelo teste da urease e reação em Tríplice Açúcar Ferro (TSI). A confirmação final foi realizada em ágar Lisina Ferro (LIA), produção de sulfito, indol e motilidade em meio SIM, redução do malonato, produção de acetoína e redução do vermelho de metila (Voges - Proskauer/ Vermelho de Metila) e utilização do citrato como única fonte de carbono (Meio Citrato de Simons ).

▪Investigação da presença de coliformes termotolerantes em hortaliças:

A análise foi fundamentada na determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes, segundo a técnica recomendada por Hitchins et al. (1992), utilizando-se três tubos por diluição. As amostras foram diluídas em tampão fosfato de Butterfield. Os tubos positivos (turvos com produção de gás), incubados a 35°C durante 24h, foram registrados e então determinados o NMP/g de acordo com a tabela de Hoskins.

-Determinação de *Escherichia coli*

De acordo com Hitchins et al. (1992), os tubos positivos de EC foram estriados separadamente em placas contendo o meio de cultura ágar Eozina Azul de Metileno (EMB) que foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Colônias nucleadas com centro preto com ou sem brilho metálico, foram selecionadas para a confirmação do microrganismo. Foram realizados os testes bioquímicos do IMViC para confirmação final, sendo consideradas como *Escherichia coli* as culturas indol positivo ou negativo, VM positivo, VP negativo e citrato negativo.

**Água de irrigação**

▪Investigação da presença de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*

As análises para a investigação de coliformes totais e termotolerantes foi feita utilizando-se a metodologia do Número Mais Provável (NMP), segundo a técnica recomendada por CLESCERI et al. (1988) para água bruta, utilizando-se cinco tubos por diluição. Para a primeira série de cinco tubos foi adicionado 10 mL da amostra em 10 mL de caldo LST em dupla concentração. Na segunda série de cinco tubos, adicionou-se 1 mL da amostra em 10 mL de caldo LST em concentração simples. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas para observar se houve crescimento com produção de gás. Foram considerados

positivo-presuntivos os tubos que apresentaram crescimento e formação de gás. A confirmação de coliformes totais foi realizada em caldo lactosado bile verde brilhante (CLBV) a 2%, determinando-se o NMP/100 mL de coliformes totais através da tabela de Hoskins.

Para a água tratada, utilizou-se cinco tubos contendo 10 mL de caldo LST em dupla concentração e acrescentou-se 10 ml da amostra. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas para observar se houve crescimento com produção de gás. Foram considerados positivo-presuntivos os tubos que apresentaram crescimento e formação de gás. A confirmação de coliformes totais foi realizada em caldo lactosado bile verde brilhante (CLBV) a 2%, incubados a 35°C por 24 horas, determinando-se o NMP/100 mL de coliformes totais através da tabela de Hoskins.

Para a confirmação de coliformes termotolerantes, uma alçada dos tubos positivos para coliformes totais foi transferida para tubos de caldo EC. Após incubação a 44,5 °C por 24 horas, os tubos mostrando produção de gás foram considerados positivos. O NMP/100 mL de coliformes termotolerantes foi determinado de acordo a tabela de Hoskins.

#### -Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

A partir dos tubos positivos de Caldo *Escherichia coli* (EC), foi estriada uma alçada em placas com ágar Eozina Azul de Metileno (EMB) que foram incubadas a 35°C por 24 horas. Colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas às provas bioquímicas do IMViC, conforme já descrito nas análises das hortaliças. Foi considerado como positivo para *Escherichia coli* as culturas com as seguintes características: Indol positivo ou negativo, VM positivo, VP negativo e citrato negativo.

#### •Análises dos resultados

Os resultados encontrados na investigação da presença de *Salmonella* spp. em hortaliças foram comparados com os padrões microbiológicos vigentes para hortaliças frescas “in natura”, de acordo com a RDC nº 12 /2001 (BRASIL, 2001a).

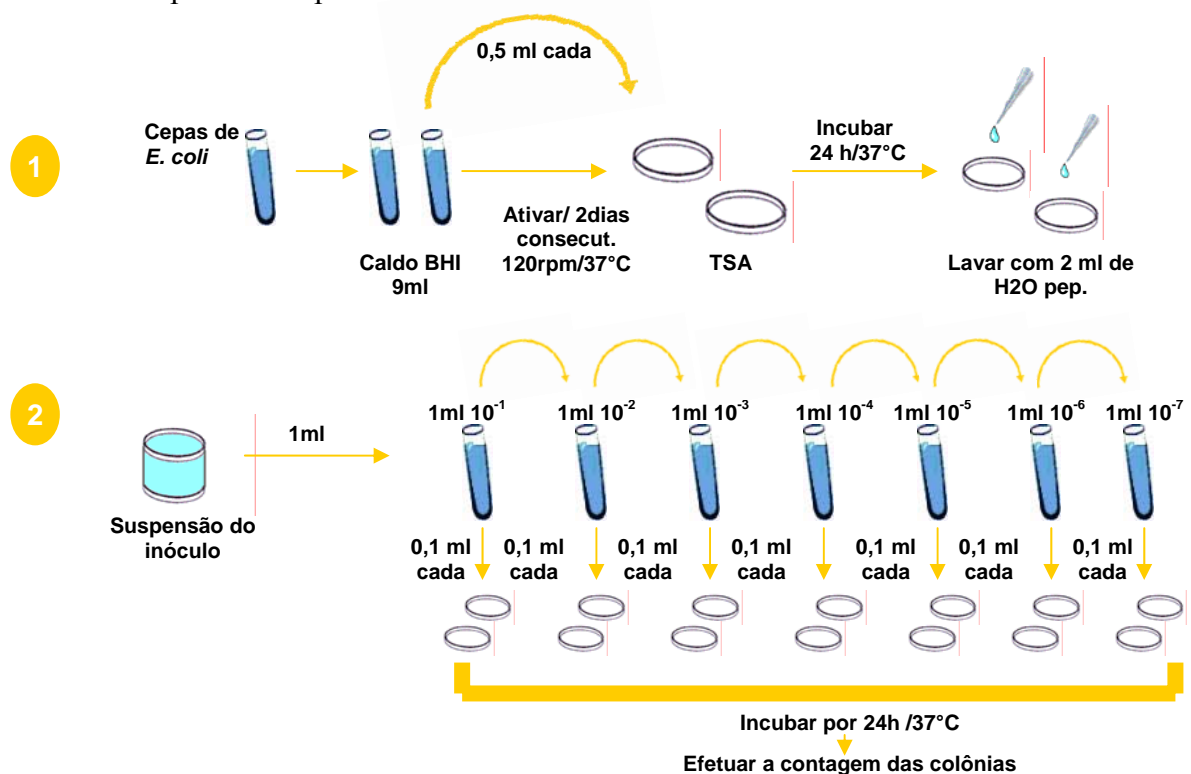
Os resultados encontrados na investigação do NMP de coliformes totais e termotolerantes na água de irrigação foram comparados com os padrões microbiológicos para a água de irrigação, de acordo com o CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, através da Resolução no.357 de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005).

#### 4.2.5 Investigação da eficiência sanitizante de soluções contendo ácidos orgânicos de cadeia curta sobre *Escherichia coli* O157: H7 e *Escherichia coli*-Ls, isolada de alface (*Lactuca sativa*)

##### •Preparo da suspensão bacteriana de *E. coli* O157: H7 e *E. coli*-Ls.

Culturas bacterianas de *E. coli* O157: H7 e *E. coli*-Ls (isolada de alface) mantidas em ágar inclinado Tryptic Soja (TSA) foram subcultivadas em caldo BHI a 37 °C por 2 dias consecutivos (48 horas), sob agitação em uma incubadora do tipo “shaker” (120 rpm). Após a incubação, 0,5 mL da cultura de *E. coli* O157: H7 ou *E. coli*-Ls foi adicionado à superfície de placas contendo ágar TSA (em duplicata), espalhando-se o inóculo com auxílio de alça de Drigalski e incubando-se as placas a 37 °C/ 24 horas. Posteriormente, a superfície das placas foram lavadas com 2 mL de água peptonada a 0,1% também com o auxílio de alça de Drigalski, transferindo-se em seguida a suspensão obtida para tubos do tipo eppendorf estéreis. A partir desta suspensão foram realizadas diluições em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% (1:10), em seguida inoculadas em duplicata na superfície de placas contendo ágar TSA. Após incubação a 37°C/ 24 horas, placas contendo entre 30 e 300 colônias foram selecionadas para contagem do microrganismo. Este experimento foi repetido por três vezes (SEGUN & KARAPINAR, 2004, 2005). Para melhor compreensão, segue a descrição do procedimento do preparo da suspensão bacteriana de *E. coli* O157: H7 e *E. coli*-Ls, conforme a Figura 1.

**FIGURA 1.** Preparo da suspensão bacteriana



### •Preparo das soluções de tratamento

Tratamento I – Vinagre de álcool

Tratamento II - Suco de limão

Tratamento III – Mistura suco de limão e vinagre (1:1)

Tratamento IV - Mistura suco de limão, vinagre e água (1:1:1)

Controle: água peptonada tamponada

Limão taiti: Foi adquirido em supermercado da rede local, lavado com água corrente, dividido em metades com faca estéril e seu suco obtido de modo asséptico.

Vinagre de álcool: Foi adquirido em supermercado da rede local

•**Determinação da acidez:** método volumétrico (v/v) expresso em ácido acético para o vinagre e a mistura de limão com vinagre (AOAC, Mét. 930.35, 2000), e ácido cítrico para o suco de limão (AOAC, Mét. 942.15, 2000).

### •Preparo da amostra

Alface do tipo crespa de cultivo tradicional, adquirida em supermercado foi submetida à remoção das folhas externas (3 a 4) e do centro. As folhas restantes foram cortadas de modo asséptico em pedaços de 3 x 3 cm (aproximadamente 1 g), lavadas em água fria corrente e secas em papel de filtro estéreis. Posteriormente, a alface cortada foi submetida à luz ultravioleta (30W, 50 cm de distância) em cabine de fluxo laminar tipo II por 30 minutos (15 min de cada lado) para reduzir a microbiota natural (SEGUN & KARAPINAR, 2004, 2005).

### •Inoculação na alface

Volume de 2 mL do inóculo de *E. coli* O157: H7 ou *E. coli*-Ls, anteriormente obtido na concentração aproximada de  $10^{10}$  foi diluído em 200 mL de água peptonada a 0,1 %, resultando em aproximadamente  $10^8$  células. Após esta etapa, 60 g de alface, já submetida ao tratamento ultravioleta acima descrito, foram imersos na solução contendo o inóculo e então agitados em incubador do tipo “shaker” (120 rpm) por 1 min, à temperatura de 21°C para



permitir a distribuição do microrganismo. Posteriormente, as folhas de alface inoculadas foram drenadas para retirar o excesso das soluções e deixadas secar por uma hora em cabine de fluxo laminar para permitir a adesão das bactérias antes dos tratamentos com as soluções (SEGUN & KARAPINAR, 2004, 2005)

#### •**Tratamentos da alface inoculada**

As folhas da alface inoculadas foram pesadas e subdivididas em porções de 10g, sendo em seguida imergidas nas soluções de tratamento por 15 minutos: 10g para suco de limão, 10g para vinagre, 10 g para a mistura suco de limão e vinagre, 10 g para suco de limão, vinagre e água e 10g para o controle (água peptonada tamponada a 0,1%) (SEGUN & KARAPINAR, 2004, 2005).

#### •**Exame da alface inoculada para verificar a eficácia dos tratamentos**

Cada porção de 10 g das amostras submetida aos tratamentos foi distribuída em sacos plásticos estéreis contendo 90 ml de água peptonada tamponada e homogeneizada em homogeneizador de pistão por dois minutos, a uma rotação de 120 rpm. Foram então realizadas as diluições decimais das amostras tratadas e do controle ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) e então se procedeu à semeadura de 0,1 mL, em duplicata, na superfície do ágar MacConkey sorbitol, suplementado com cefixina-telurito (0,05 mg/L, 2,5 mg/L) para a cepa de *Escherichia coli* O157: H7, e ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para a cepa de *Escherichia coli*-LS. Após incubação a 37 °C por 24 horas, placas contendo entre 25 e 250 colônias foram selecionadas para as contagens. Para *Escherichia coli* O157: H7, foram contadas no ágar MacConkey as colônias brancas, sorbitol negativas, e para *E. coli*-Ls no ágar EMB as colônias nucleadas com centro preto com ou sem brilho metálico (SEGUN & KARAPINAR, 2004, 2005).

As colônias isoladas de *E. coli* O157: H7 após os tratamentos foram confirmadas para a presença de citotoxinas (shiga toxina) em células Vero (SALVADORI et al., 1997) e pela sorologia (BLANCO et al., 1992, 1996) e as colônias isoladas de *E. coli*-LS foram confirmadas pelo IMViC (HITCHINS et al., 1992)

#### **4.2.6 Investigação da presença de citotoxinas nas cepas isoladas de *E. coli*.**

A detecção biológica das citotoxinas de *E. coli* foi realizada em estudo utilizando linhagens de celulares VERO (rim de macaco verde africano) (SALVADORI et al. 1997), e a determinação do antígeno “O” através da aglutinação em placas. A metodologia empregada

foi proposta pelo Laboratório de Referência de *Escherichia coli* (LREC) da Universidade de Santiago de Compostela – *Campus* de Lugo – Espanha, e está baseada em Guineé et al. (1972), modificada por Blanco et al. (1992) e Blanco et al. (1996).

#### **•Interpretação dos resultados e análise estatística**

Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmos e o número de reduções decimais (RD) foi calculado através da diferença entre a contagem inicial das células (controle) e a contagem final obtida após os tratamentos. Para a avaliação estatística foi utilizada a análise de variância e o teste de Duncan (R versão 2.3) para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores médios das contagens microbianas obtidas após os tratamentos.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Caracterização e investigação das condições higiênico-sanitárias das hortas**

A Tabela 1 demonstra algumas características das hortas investigadas nesse estudo. As mesmas estão localizadas em três bairros distintos do Distrito Sanitário Cabula Beirú em Salvador - Ba. A produção das hortaliças encontra-se estabelecida nestes locais em um período longo, variando entre 08 a mais de 30 anos. A área de ocupação das mesmas também é bastante significativa, variando entre 5.798 m<sup>2</sup> a 35.176 m<sup>2</sup>. A produção é representada principalmente por hortaliças folhosas, variando entre 130 a 1150 maços/dia e o destino desta produção são as feiras livres da cidade de Salvador e comércio local deste distrito. Segundo informações relatadas pelos proprietários, estas hortas contribuem com a maior parte do abastecimento de hortaliças folhosas das feiras livres, portanto o seu consumo não está restrito somente aos moradores locais.

Avaliando a situação higiênico-sanitária da área de cultivo, sobre os aspectos de presença de focos de insalubridade, lixo, objetos em desuso, presença de animais vadios e roedores, constatou-se que três hortas (60%) encontravam-se em condições satisfatórias e as outras não atenderam a estes requisitos. Foi visualizada durante as visitas a presença de animais (cães, gatos e eqüídeos) dentro ou próximo a algumas destas hortas, sendo que a presença de roedores foi uma queixa referida pelos próprios trabalhadores. A presença de lixo disposto de maneira irregular também foi outra constatação observada e o descarte e coletas irregulares foram fatores apontados como justificativa para esta situação.

Estas irregularidades constituem importantes fontes de contaminação para as hortaliças e segundo Moreti (2003), a presença de animais circulando nas hortas ou em áreas próximas pode contaminar as hortaliças através de patógenos presentes em suas fezes. Da mesma forma, a presença de lixo em área próxima ao local de produção também constituiu uma fonte potencial de bactérias patogênicas (EMBRAPA, 2001b).

**Tabela 1. Caracterização das hortas do Distrito Sanitário Cabula Beiru (DSCB) de****Salvador - Ba e avaliação pelo “check-list”.**

| <i>Hortas/<br/>Identifi-<br/>cação</i> | <i>Locali-<br/>zação/<br/>Bairro</i> | <i>Tempo<br/>de<br/>existência<br/>(anos)</i> | <i>Tipo<br/>de<br/>cultivo</i>                                   | <i>Área<br/>cul-<br/>tida<br/>(m<sup>2</sup>)</i> | <i>Produ-<br/>ção<br/>(*maços/<br/>dia)</i> | <i>Destino<br/>da produção</i>          | <i>Resultado<br/>“check-<br/>list”</i> |
|--|--------------------------------------|---|--|---|---|---|--|
| 3                                      | Saramandaia                          | 25  | Hortelã, alface, couve, manjerição e coentro.                    | 5.798   | 387   | Feira São Joaquim                       | PÉSSIMA                                |
| 2                                      | Saramandaia                          | 30  | Hortelã, alface, couve, manjerição, coentro, cebolinha e quiabo. | 35.176  | 1150  | Feira São Joaquim, Feira da Sete Portas | PÉSSIMA                                |
| 6                                      | Cabula VI                            | 08  | Alface, coentro, couve, hortelã e quiabo.                        | 14.375  | 130   | Comércio local                          | BOA                                    |
| 5                                      | Cabula VI                            | > 20  | Alface, coentro, couve, hortelã, cebolinha e quiabo.             | 8.400   | 135   | Comércio local                          | REGULAR                                |
| 9                                      | Saboeiro                             | >10   | Alface, coentro, couve, hortelã e quiabo.                        | 8.460   | 650   | Feira da Sete Portas, Comércio local    | BOA                                    |

\* Maço refere-se a uma porção de aproximadamente 200 g

Nenhuma das hortas investigadas possuía local para armazenamento das hortaliças e, segundo os proprietários, as mesmas eram colhidas, lavadas em um reservatório de água de forma irregular e imediatamente colocadas no veículo para serem transportadas.

Apenas 40% das hortas estavam localizadas em área livre de alagamento, as demais, pela situação desordenada do uso do solo ou por estarem em terrenos bastante íngremes, ficavam expostas a alagamentos no período de altos índices pluviométricos. A topografia local da maioria das hortas estudadas favorece ao escoamento das águas superficiais contaminadas para dentro das lavouras, podendo atingir também as nascentes, cisternas e os riachos. Essa situação favorece o transporte de microrganismos patogênicos pela água, o que representa um fator importante na disseminação de processos infecciosos (RIVERA & MARTINS, 1996).

A presença de esgoto a céu aberto foi detectada em duas hortas (40%), e, estas águas servidas escoavam próximas às culturas e eram despejadas nos riachos que circulam as mesmas. Sabe-se que estas águas são fontes potenciais de bactérias patogênicas, sendo este um risco eminente de contaminação das hortaliças (LEITE, 2000).

Em nenhuma das hortas foi detectada a presença de instalações sanitárias para os trabalhadores, o que pode conduzir a hábitos higiênicos inadequados, contribuindo para a contaminação das hortaliças por dejetos humanos, como também comprometendo a manipulação correta dos alimentos (LEITE, 2000).

Foi verificado que o abastecimento da água utilizada para irrigação e lavagem das hortaliças era feito através de poços artesianos, riachos e nascentes existentes no local. Em apenas uma (01) horta havia a utilização eventual de água potável. Este foi um dos fatores de risco mais presentes nas hortas, ou seja, constatou-se as péssimas qualidades das fontes de água disponíveis para a irrigação e demais operações durante o cultivo das hortaliças, destacando-se ainda o fato de que em 100% das hortas estas águas não recebiam nenhum tipo de tratamento antes de serem usadas. Resultado semelhante foi relatado por Leite (2000), que estudando as condições ecológicas das hortas de Fortaleza - CE, concluiu também que em 100% das hortas as águas estavam sujeitas a contaminação e não recebiam nenhum tratamento prévio.

Em todas as hortas investigadas era utilizado o esterco bovino ou de aves como adubo e os mesmos não possuíam nenhum tipo de registro ou informação pertinente. Segundo orientações técnicas, estes produtos deveriam passar por um processo de compostagem para diminuir a carga microbiana. Outra constatação observada foi o uso inadequado deste adubo sobre as culturas, pois segundo recomendações técnicas, os mesmos não devem ser aplicados próximos aos dias de colheita, fato este observado durante as visitas. O adubo orgânico quando indevidamente tratado ou armazenado pode conter patógenos e contaminar as hortaliças, ressaltando-se também a importância de um manejo adequado durante a sua aplicação (TAUXE, 1997).

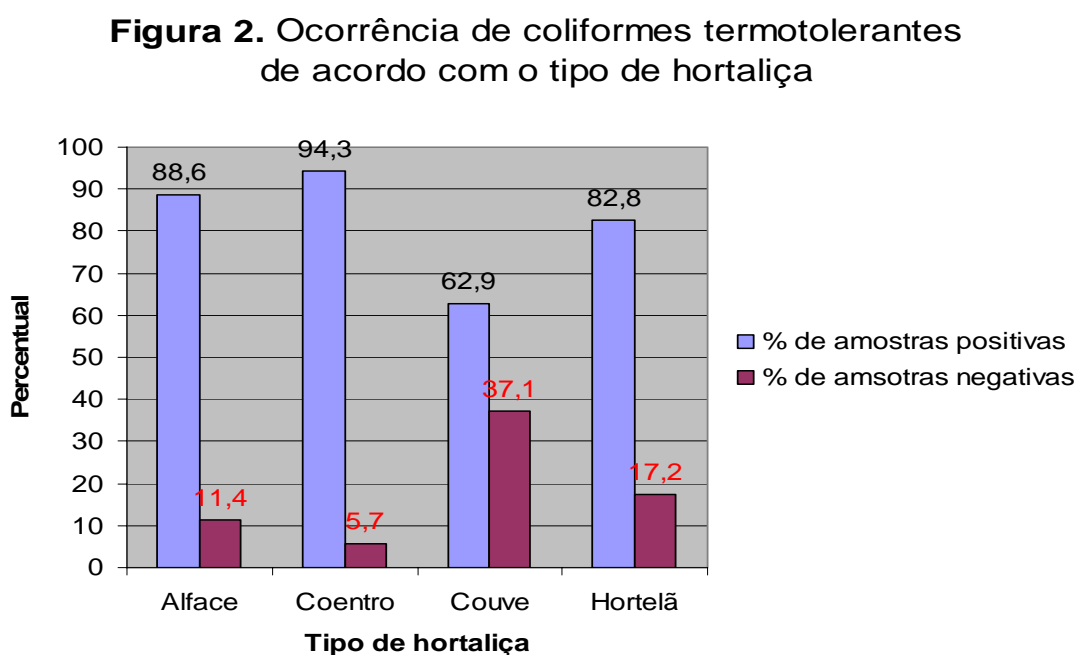
O estado de saúde dos trabalhadores destas hortas foi avaliado através da presença do Atestado de Saúde Ocupacional - ASO, visita ao médico nos últimos seis meses e ocorrência de diarreia. A maioria dos funcionários (80%) não possuía ASO ou visitou o médico nos últimos seis meses. Apenas em uma (01) horta houve relato da visita ao médico por seus

funcionários. A ocorrência de diarreia não foi referida. De acordo com Silva Jr. (2001), a saúde e a higiene pessoal dos trabalhadores que entram em contato direto com a hortaliça, devem ser monitoradas, pois a presença de alguns tipos de moléstias pode veicular microrganismos para os alimentos.

Todas as questões referidas acima foram investigadas através da aplicação do “check-list” e, de acordo com a pontuação obtida, as hortas foram classificadas em: excelente (9,0 a 10,0), boa (7,0 a 8,9), regular (5,0 a 6,9), ruim (3,0 a 4,9) e péssima (0,0 a 2,9). Atendendo a esses critérios, duas (02) hortas foram classificadas como “boas”, pontuação igual a 7,0 (hortas 6 e 9), uma (01) como “regular” (horta 5), pontuação igual a 6,0 e duas (02) como “péssimas”, pontuação igual a 1,0 (hortas 2 e 3) Entretanto, mesmo as hortas classificadas como “boa” ou “regular”, apresentaram alguma irregularidade, que poderia vir a comprometer a qualidade do produto final, principalmente considerando os aspectos relacionados à água utilizada para a irrigação.

## 5.2 Investigação da qualidade higiênico-sanitária das hortaliças

Os resultados das análises microbiológicas das hortaliças revelaram elevadas concentrações de coliformes termotolerantes nas amostras investigadas ( Figura 2).



A Tabela 2 demonstra o percentual de amostras positivas para esse grupo de microrganismo. Dessa forma, verifica-se que o microrganismo estava presente em 82,1% das amostras avaliadas, e que o coentro foi a hortaliça que apresentou um maior percentual de amostras positivas (Tabela 2).

**Tabela 2. Ocorrência de coliformes termotolerantes em hortaliças cultivadas em hortas do Distrito Sanitário de Salvador - BA.**

| Hortaliças   | Nº de amostras analisadas | Nº de amostras positivas | % de amostras Positivas |
|--------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Alface       | 35                        | 31                       | 88,6                    |
| Coentro      | 35                        | 33                       | 94,3                    |
| Couve        | 35                        | 22                       | 62,9                    |
| Hortelã      | 35                        | 29                       | 82,8                    |
| <b>Total</b> | <b>140</b>                | <b>115</b>               | <b>82,1</b>             |

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram relatados por Ribeiro et al. (2005), que avaliando 60 amostras de alface colhidas em hortas da Ilha de São Luís - MA, encontrou 83,3% de amostras positivas para coliformes termotolerantes. Nogueira (2002) encontrou índices inferiores para este grupo de bactérias nas hortaliças da cidade de Jaboticabal - SP, verificando que apenas 19,4% das 36 amostras estavam contaminadas. Pacheco (2002) avaliando as hortaliças provenientes do setor varejista em Sorocaba - SP constatou que 45 amostras de um total de 105 estavam contaminadas por coliformes termotolerantes. Takayanagui et al (2001) demonstraram que 63% das hortaliças comercializadas em 115 estabelecimentos do município de Ribeirão Preto - SP estavam contaminadas por coliformes termotolerantes. Por sua vez, Santana et al (2006) avaliando a qualidade da alface comercializada em supermercados na cidade de Salvador-Ba, apontaram os baixos padrões higiênicos encontrados, representados pela presença de formas parasitológicas e alta concentração de coliformes fecais.

Apesar da Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001) do Ministério da Saúde, não propor limites para a presença de coliformes termotolerantes para hortaliças cruas ou *in natura*, o presente estudo demonstra a necessidade de fixar padrões microbiológicos, considerando inclusive o relato de um surto recente de *Escherichia coli* O157: H7 em 26 estados americanos, cujo veículo apontado foi o espinafre (FDA, 2006c).

Em relação aos padrões microbiológicos, a ANVISA fixa limites para coliformes termotolerantes apenas para o grupo de hortaliças “prontas para o consumo”, ou seja, que tenham sofrido algum tipo de processamento, estabelecendo um limite de  $10^2$  NMP/g (BRASIL, 2001).

Os resultados obtidos no presente estudo apontaram valores com limites de até 1500 NMP/g para algumas amostras analisadas. A presença de índices elevados destes microorganismos no produto *in natura* pode interferir na eficácia do processo de higienização, comprometendo a redução microbiana desejada, afetando assim a segurança sanitária do produto.

Estudo conduzido por Santana et al. (2006) demonstrou que quanto maior a contaminação inicial do produto menor é a eficiência do processo de lavagem das hortaliças.

Na Tabela 2, verifica-se que embora o maior percentual de amostras contaminadas tenha sido observado no coentro, a alface e a hortelã também apresentaram um alto percentual de amostras positivas para coliformes termotolerantes, 88,6% e 82,8%, respectivamente. O coentro e a hortelã possuem folhas múltiplas e separadas, permitindo assim uma boa fixação para as bactérias, a alface, por sua vez, possui folhas largas, justapostas e flexíveis podendo ocorrer contato direto com o solo durante o cultivo. No caso da couve, onde se observou um percentual menor de contaminação, o fato de o seu desenvolvimento ocorrer afastado do solo pode justificar este resultado (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 2005).

De acordo com a Tabela 3, os valores mínimos e máximos do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes isolados das hortaliças, variaram entre  $< 0,3$  a 1500 NMP/g. Observou-se que todas as hortas apresentaram hortaliças com valores variáveis de contaminação, sendo que a couve foi a hortaliça que apresentou menores índices de contaminações em todas as cinco hortas investigadas, corroborando com os resultados já apresentados (Tabela 2) em relação ao percentual de amostras positivas.

**Tabela 3. Valores mínimos e máximos do Número Mais Provável NMP/ g de coliformes termotolerantes em hortaliças cultivadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba.**

| Hortaliças | Horta 2        | Horta 3        | Horta 5        | Horta 6        | Horta 9        |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Alface     | 110 a 1500     | 15 a 1500      | $< 0,3$ a 1500 | $< 0,3$ a 1500 | $< 0,3$ a 430  |
| Coentro    | 110 a 1500     | 2,3 a 1500     | 4 a 1100       | $< 0,3$ a 1100 | $< 0,3$ a 1100 |
| Couve      | $< 0,3$ a 1100 | $< 0,3$ a 4,3  | $< 0,3$ a 110  | $< 0,3$ a 110  | $< 0,3$ a 110  |
| Hortelã    | $< 0,3$ a 1500 | $< 0,3$ a 1500 | $< 0,3$ a 1500 | $< 0,3$ a 1500 | $< 0,3$ a 1100 |



A Tabela 4 demonstra os resultados para a frequência de isolamento de coliformes termotolerantes nas hortaliças conforme a horta estudada. Os maiores índices de contaminação para este grupo de microrganismo foram representados pelas hortas denominadas como 2 e 3, seguidas da horta 5, estando as hortas 6 e 9 com percentuais equivalentes.

De acordo com o “check-list” as hortas classificadas como péssimas (hortas “dois” e “três”), regular (horta “cinco”) e boa (horta “seis”), apresentaram elevados índices de contaminação para coliformes termotolerantes nas hortaliças. Inclusive observa-se amostras de couve obtidas da horta “dois” com elevado NMP. Apenas na horta “nove”, classificada como “boa” é que foi observado índices mais baixos de coliformes termotolerantes para as hortaliças alface e couve. Diante desses resultados, observa-se que os valores mais baixos encontrados para o grupo coliformes termotolerantes foram determinados pelo tipo de hortaliça (couve) e não pelo tipo da horta investigada, ou seja, em alguns casos não se observou correlação positiva entre a análise visual das hortas pelo “check-list” e as análises microbiológicas das hortaliças dessas hortas.

Analisando do ponto de vista de percentual de amostras positivas para a presença de coliformes termotolerantes, pode-se observar na Tabela 4 que as hortas classificadas como “boas”, hortas 6 e 9, apresentaram um menor percentual de amostras positivas (75%), mas esse índice também foi elevado, não merecendo portanto a classificação obtida pelo “check-list”.

**Tabela 4. Ocorrência de coliformes termotolerantes em hortaliças de acordo com a horta do DSCB de Salvador - Ba.**

| HORTA        | No de amostras analisadas | Coliformes termotolerantes |                         |
|--------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|
|              |                           | No de amostras positivas   | % de amostras positivas |
| Horta 2      | 24                        | 22                         | 91,7                    |
| Horta 3      | 24                        | 21                         | 87,5                    |
| Horta 5      | 36                        | 30                         | 83,3                    |
| Horta 6      | 20                        | 15                         | 75,0                    |
| Horta 9      | 36                        | 27                         | 75,0                    |
| <b>Total</b> | <b>140</b>                | <b>115</b>                 | <b>82,1</b>             |

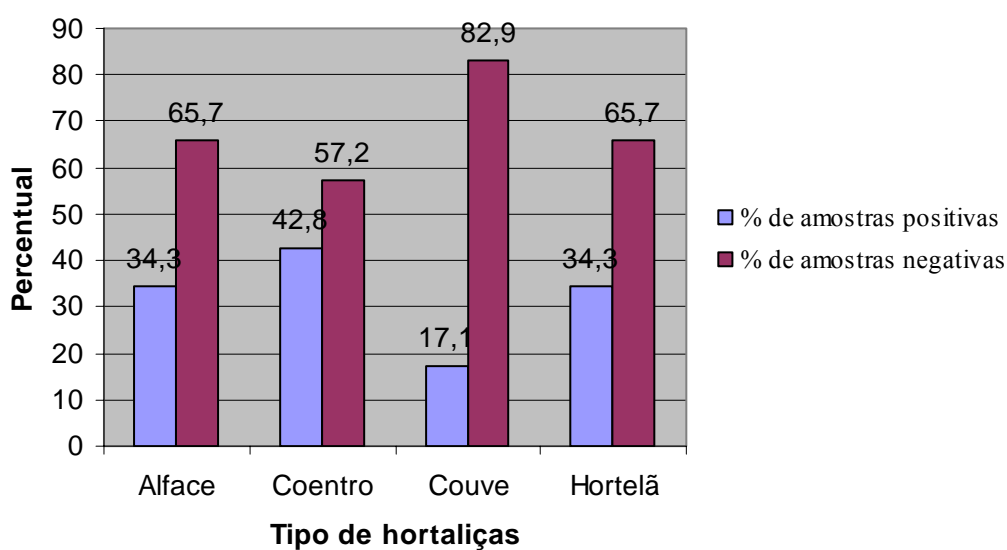
A Tabela 5 e a Figura 3 demonstram a contaminação das hortaliças por *Escherichia coli*. A hortaliça que apresentou maior contaminação por *Escherichia coli* foi o coentro, com 42,8 % de amostras positivas. Este resultado está de acordo com os obtidos para o grupo

coliformes termotolerantes, onde o coentro foi também o mais contaminado. A alface e a hortelã apresentaram os mesmos índices de contaminação e a couve foi novamente a que apresentou menor número de amostras contaminadas.

**Tabela 5. Presença de *Escherichia coli* de acordo com o tipo de hortaliça cultivada em hortas do DSCB de Salvador - Ba.**

| Hortaliças | No. de amostras analisadas | No. de amostras positivas | % de amostras positivas |
|------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Alface     | 35                         | 12                        | 34,3                    |
| Coentro    | 35                         | 15                        | 42,8                    |
| Couve      | 35                         | 6                         | 17,1                    |
| Hortelã    | 35                         | 12                        | 34,3                    |

**Figura 3. Ocorrência de *E. coli* de acordo com o tipo de hortaliça cultivadas em hortas do DSCB/ Salvador-Ba**



A Tabela 6 demonstra a contaminação por *Escherichia coli* nas hortaliças conforme a horta investigada. Aquelas com maiores percentuais de isolamento do microrganismo foram a hortas 3, 5 e 2, na ordem. Esses resultados foram semelhantes àqueles encontrados para os coliformes termotolerantes. Embora a horta 5 (classificada como regular) tenha apresentado um índice de amostras contaminadas inferior ao da horta 3 (classificada como péssima), a diferença observada na frequência de amostras contaminadas foi pequena (1,4%). Verifica-se também que os índices de isolamento de *E. coli* nas amostras providas das hortas 6 e 9 (classificadas como boas) foram inferiores aos demais. Entretanto, para estar de acordo com a

classificação “boa” obtida pelo “check-list”, o ideal seria que o microrganismo não fosse isolado nas amostras dessas hortas. Assim, pode-se observar mais uma vez a falta de correlação entre a análise visual e as análises microbiológicas. Esses resultados indicam a necessidade de revisão e validação das pontuações usadas no “check-list”, dando ênfase a itens que talvez tenham sido pouco valorizados nessa análise.

**Tabela 6. Presença de *Escherichia coli* em hortaliças de acordo com as hortas do DSCB de Salvador - Ba.**

| HORTA   | No. de amostras analisadas | <i>Escherichia coli</i>   |                         |
|---------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
|         |                            | No. de amostras positivas | % de amostras positivas |
| Horta 2 | 24                         | 9                         | 37,5                    |
| Horta 3 | 24                         | 11                        | 45,8                    |
| Horta 5 | 36                         | 14                        | 38,9                    |
| Horta 6 | 20                         | 4                         | 20,0                    |
| Horta 9 | 36                         | 7                         | 19,4                    |
| Total   | 140                        | 45                        | 32,1                    |

Observando a Tabela 6, verifica-se que a *E. coli* foi encontrada em 32,1% das amostras analisadas, evidenciando uma contaminação de origem fecal, confirmando as precárias condições higiênicas durante a produção destas hortaliças. A presença de *E. coli* nas amostras das hortaliças também adverte para a possibilidade da presença de cepas patogênicas, causadoras de surtos de toxinfecção alimentar (SILVA et al, 2003; NATARO & KAPER, 1998).

Rosa et al. (2005) avaliando hortaliças em hortas comunitárias da cidade de Campos – RJ encontraram índices superiores aos encontrados no presente estudo, ou seja, 43,3% de positividade das amostras para *E. coli*. Ainda, Nascimento et al. (2005) encontraram índices de positividade mais altos para este microrganismo (66%), ao analisarem amostras provenientes de feiras livres e mercados de São Luís - MA.

A ocorrência de cepas patogênicas de *E. coli* em nosso meio foi demonstrada por Melo et al (2001), ao avaliar o perfil epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade de Recife - Pe, no período de 2000 a 2001. Os autores demonstraram que dos 57 surtos confirmados, o agente causador mais prevalente foi a *Escherichia coli*, respondendo por 43,3% dos surtos e 33,5% de doentes.

Como já mencionado anteriormente, vários fatores de risco foram identificados nas hortas investigadas, que provavelmente favoreceram a contaminação por esta bactéria. Entre estes o uso de água contaminada por dejetos humanos, o uso de adubo orgânico indevidamente tratado, a ausência de instalações sanitárias, a presença de águas servidas próximas às hortaliças e a presença de animais circulando dentro das hortas. Ressalta-se ainda, a pré-lavagem das hortaliças após a sua colheita em tanques com águas contaminadas. Esta atividade, conforme demonstrado por estudo anterior conduzido por Nogueira (2002), aumentou o NMP médio de coliformes termotolerantes presentes nas verduras em 56,7 %. Nessa linha, resultados semelhantes são apresentados por Takayanagui et al. (2006) que constataram que 38% da água de lavagem das hortaliças de 45 cadeias produtivas da cidade de Ribeirão Preto - SP apresentava irregularidades.

As análises realizadas para a presença de *Salmonella* spp. demonstraram que o microrganismo não estava presente nas amostras investigadas.

Estes resultados apontam que as amostras analisadas estão de acordo com a Resolução RDC no.12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que estabelece para hortaliças *in natura* a ausência de *Salmonella* em 25 g de produto.

Estes resultados foram diferentes daqueles descritos por Takayanagui et al (2000), em Ribeirão Preto, SP, que encontraram a presença de *Salmonella* spp. em 3,1% das hortaliças provenientes de 129 hortas investigadas. Posteriormente, em outro estudo, estes mesmos autores encontraram contaminação por *Salmonella* em 9% das amostras de hortaliças provenientes de 172 estabelecimentos na mesma cidade (TAKAYANAGUI et al., 2001).

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram apresentados por Santana et al. (2006) ao avaliarem 180 amostras de alface provenientes de supermercados da cidade de Salvador - Ba, ou seja, os autores não detectaram a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras analisadas. Nascimento et al. (2005) analisando 42 amostras de alface comercializadas em quatro feiras livres e em um mercado do município de São Luís - MA, também demonstraram a ausência de *Salmonella* spp.

De acordo com Oliveira & Junqueira (2005), em locais onde as práticas higiênico-sanitárias não são adequadas, pela utilização de água contaminada para irrigar hortaliças ou até mesmo através do uso de esterco bovino como adubo, o risco de contaminação por patógenos como *Salmonella* spp. aumenta. Dessa forma, é importante o monitoramento

constante da presença desse microrganismo nas hortaliças, principalmente naquelas consumidas cruas.

Pelos resultados apresentados, verifica-se a necessidade de revisão de alguns pontos na estruturação do “check-list”, como por exemplo, a inclusão de mais itens para serem avaliados e a revisão da pontuação dada a cada item. É também necessário verificar a sua aplicabilidade em um maior número de hortas para validar os resultados encontrados, inclusive através das análises microbiológicas. Porém, não podemos deixar de comentar sobre a importância deste instrumento neste estudo, pois através dele obtivemos informações relativas às condições sanitárias do ambiente, as práticas agrícolas adotadas e outras informações relativas aos trabalhadores do local.

Diante do exposto, verificar a qualidade sanitária de hortaliças através de diagnóstico laboratorial de patógenos, é de grande importância para a saúde pública, pois estes dados nos oferecem subsídios sobre as condições higiênicas envolvidas durante a sua produção, como também armazenamento, transporte e manuseio desses produtos, permitindo um controle retrospectivo das condições em que foram cultivadas (TAKAYANAGUI et al. 2000).

### **5.3 Investigação da qualidade sanitária da água de irrigação**

Os resultados encontrados nas análises microbiológicas das águas utilizadas para irrigação das hortaliças revelaram elevadas concentrações de coliformes totais e coliformes termotolerantes nas amostras investigadas. O Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes obtido nas análises das amostras durante o estudo variou de  $< 2,2$  a  $> 1600$  e  $< 2,0$  a  $> 1600$  NMP/100ml, respectivamente (Tabela 7). Constatou-se que 68,9% das amostras de água analisadas apresentaram valores igual ou superior a 1600 NMP/100 ml para coliformes totais e 53,3% apresentaram estes mesmos valores para coliformes termotolerantes.

**Tabela 7. Valores mínimos e máximos do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes em águas de irrigação, utilizadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba.**

| <b>Horta</b> | <b>Coliformes totais<br/>NMP/100 mL</b> | <b>Coliformes termotolerantes<br/>NMP/ 100 mL</b> |
|--------------|---|---|
| Horta 2      | 30 a > 1600                             | 30 a >1600  |
| Horta 3      | 300 a > 1600                            | 240 a >1600                                       |
| Horta 5      | 30 a > 1600                             | < 2,0 a 1600                                      |
| Horta 6      | 240 a > 1600                            | 240 a >1600                                       |
| Horta 9      | >1600                                   | >1600   |

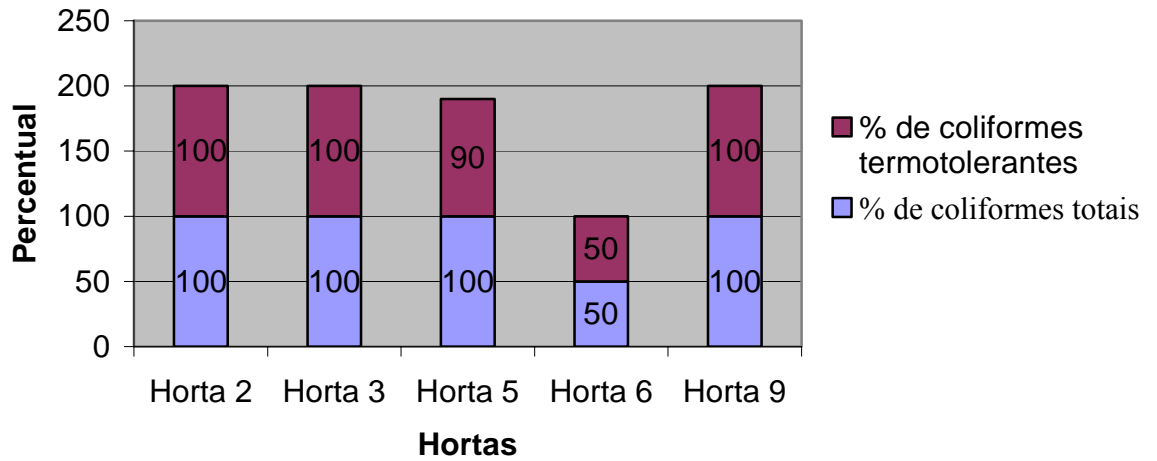
A Tabela 8 e Figura 4 apresentam os percentuais de contaminação por coliformes totais e termotolerantes na água de irrigação de acordo a horta estudada. Onde 89% das hortas foram positivas para coliformes totais e 87% para coliformes termotolerantes. Entre as cinco hortas estudadas, quatro (80%) delas apresentaram 100% das amostras positivas para coliformes totais e três (60%) apresentaram 100% das amostras positivas para coliformes termotolerantes. A horta denominada como “seis” e classificada como “boa” pelo “check-list” foi a que apresentou um menor percentual de amostras contaminadas (50%), mas também preocupante. Entretanto, a horta “nove”, também classificada como “boa”, apresentou todas as amostras contaminadas pelos grupos dos microrganismos investigados. Novamente, pode-se observar a perda de correlação entre a análise visual pelo “check-list” e as análises microbiológicas.

**Tabela 8. Frequência de coliformes totais e coliformes termotolerantes em águas de irrigação, utilizadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba.**

| <b>Horta</b> | <b>Total de amostras</b> | <b>*Amostras positivas para coliformes totais</b> |           | <b>*Amostras positivas para coliformes termotolerantes</b> |           |
|--------------|--------------------------|---|-----------|--|-----------|
|              |                          | <b>No.</b>  | <b>%</b>  | <b>No.</b>   | <b>%</b>  |
| Horta 2      | 10                       | 10  | 100,0     | 10   | 100,0     |
| Horta 3      | 10                       | 10  | 100,0     | 10   | 100,0     |
| Horta 5      | 10                       | 10  | 100,0     | 9  | 90,0      |
| Horta 6      | 10                       | 5   | 50,0      | 5  | 50,0      |
| Horta 9      | 5                        | 5   | 100,0     | 5  | 100,0     |
| <b>Total</b> | <b>45</b>                | <b>40</b>   | <b>89</b> | <b>39</b>  | <b>87</b> |

Foram consideradas positivas amostras com resultados > 2,2 para água bruta e >2,0 para água potável.

**Figura 4. Ocorrência de coliformes totais e termotolerantes em águas de irrigação de hortas do DSCB de Salvador-Ba**

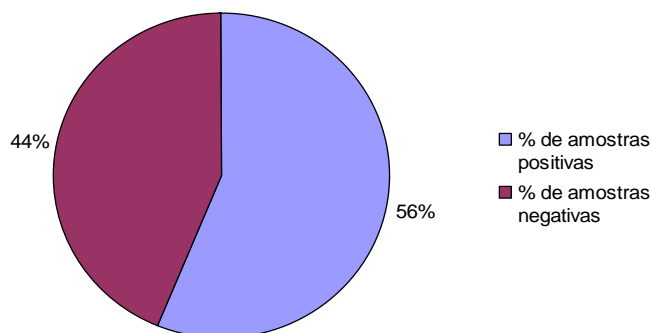


A Tabela 9 e Figura 5 apresentam a porcentagem de amostras de águas contaminadas por *E. coli*. Observa-se que mais da metade das amostras estava contaminada pelo microrganismo (55,6%). Observa-se também que a horta “três” foi a que apresentou um maior índice de amostras contaminadas, ou seja, de 10 amostras investigadas para a presença do microrganismo, 9 estavam contaminadas. Em relação à horta “nove” apesar da mesma ter apresentado 100% de contaminação por coliformes termotolerantes (Tabela 8), apenas 40% das amostras apresentaram *E. coli*.

**Tabela 9. Frequência de *Escherichia coli* em águas de irrigação utilizadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba.**

| Horta        | * Total de amostras analisadas | <i>Escherichia coli</i> |              |
|--------------|--------------------------------|-------------------------|--------------|
|              |                                | Presença (No.)          | Presença (%) |
| Horta 2      | 10                             | 7                       | 70,0         |
| Horta 3      | 10                             | 9                       | 90,0         |
| Horta 5      | 10                             | 2                       | 40,0         |
| Horta 6      | 10                             | 5                       | 50,0         |
| Horta 9      | 5                              | 2                       | 40,0         |
| <b>TOTAL</b> | <b>45</b>                      | <b>25</b>               | <b>56</b>    |

**Figura 5. Ocorrência de *Escherichia coli* na água de irrigação**



A maioria dos estudos da literatura científica cita a água de irrigação como uma das principais fontes de contaminação microbiológica das hortaliças durante o seu cultivo (OLIVEIRA, 1992; TAKAYANAGUI, 2001; SILVA et al., 2005). No presente estudo, os resultados das análises microbiológicas da água utilizada para a irrigação demonstraram índices elevados de contaminação por coliformes totais (89%), coliformes termotolerantes (87%) e *Escherichia coli* (55,6%). Estes achados assemelham-se aos encontrados por Leite (2000) em Fortaleza - CE, Marques (2002) em Goiânia - GO, Souto (2005) em Lagoa Seca - PB, Ribeiro (2005) em São Luís - MA e Nogueira (2003) em Jaboticabal - SP, reforçando a problemática do alto grau de contaminação microbiana das águas utilizadas para irrigação de hortaliças no Brasil.

O padrão microbiológico vigente em nosso país (CONAMA, 2005) estabelece para água destinada à irrigação de hortaliças consumidas cruas um limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Nossos resultados apontaram que 68,9% (Tabela 10) das amostras apresentaram limites superiores a este, demonstrando o total descumprimento à lei e a ausência de controle por parte dos órgãos responsáveis.

Conforme a Tabela 10 e Figura 6, o percentual de amostras que não atenderam ao padrão microbiológico para a água de irrigação foi de 69%, destacando-se as hortas 3 e 9 com 100% das amostras reprovadas de acordo com este critério. Observa-se ainda que as hortas 2 e 6 apresentaram-se com 90% e 50% das suas amostras, respectivamente, não atendendo ao



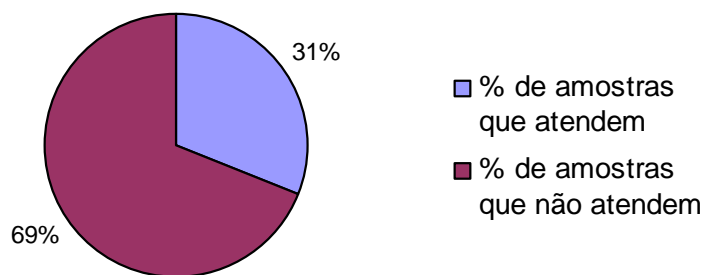
padrão da CONAMA. A horta 5 foi a que apresentou melhor qualidade da água, com apenas 20% de amostras fora do padrão.

**Tabela 10. Percentual de amostras da água de irrigação que não atenderam ao padrão microbiológico para coliformes termotolerantes (CONAMA, 2005).**

| Hortas       | Total de amostras analisadas | *Amostras que não atendem ao padrão |           |
|--------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------|
|              |                              | No.                                 | %         |
| Horta 2      | 10                           | 9                                   | 90,0      |
| Horta 3      | 10                           | 10                                  | 100,0     |
| Horta 5      | 10                           | 2                                   | 20,0      |
| Horta 6      | 10                           | 5                                   | 50,0      |
| Horta 9      | 5                            | 5                                   | 100,0     |
| <b>TOTAL</b> | <b>45</b>                    | <b>31</b>                           | <b>69</b> |

\* A legislação vigente no Brasil estabelece o padrão < 200 coliformes termotolerantes / 100ml em águas de irrigação de hortaliças consumidas cruas ( CONAMA, 2005).

**Figura 6. Percentual de amostras da água de irrigação que não atenderam ao padrão da CONAMA**



A Organização Mundial da Saúde (OMS, 1995), estabelece como limite aceitável para a água de irrigação de hortaliças o valor de 1.000 coliformes fecais por 100 mL da amostra. Mesmo levando-se em consideração este padrão, a maioria dos valores encontrados neste estudo, ultrapassou este limite.

Evidencia-se com estes resultados mais uma vez, as precárias condições sanitárias das águas e o manejo agrícola inadequado, principalmente por tratar-se da irrigação de alimentos que serão consumidos crus.

Nas hortas investigadas nesse estudo, verificou-se que a irrigação era feita através de mangueiras, sendo as águas jogadas diretamente sobre as hortaliças, o que, portanto, pode ter favorecido a contaminação. Outros fatores que podem ter contribuído para a contaminação resultante destas águas, são: o lançamento de esgotos domésticos diretamente nos riachos utilizados como fontes de irrigação, a proximidade de cisternas e nascentes, terreno íngreme sujeito a alagamento, a ausência de instalações sanitárias, e armazenamento indevido dos esterco.

Segundo estudo conduzido por Matos (2003), quando a água de irrigação é utilizada pelo método de gotejamento, com manejo adequado, pode-se evitar a contaminação das culturas, pois este sistema deposita a água diretamente nas raízes, evitando-se a contaminação das folhas.

Na análise comparativa entre os resultados obtido pelo “check-list” e as análises microbiológicas para a presença de coliformes termotolerantes, verifica-se que as hortas classificadas como “péssimas” (hortas “dois” e “três”) apresentaram 100% das amostras contaminadas. O mesmo ocorreu com a horta “nove”, classificada como “boa”, porém esta comparação fica prejudicada se considerarmos o baixo número de amostras analisado (apenas 5). Em relação à horta “cinco”, classificada como “regular” pelo “check-list”, a mesma apresentou 90% das amostras positivas para este grupo de microrganismo e a horta “seis”, classificada como “boa” apresentou 50% das amostras contaminadas. Esses resultados apontam também a baixa correlação entre a análise visual e as análises microbiológicas, necessitando de revisão e validação do formulário empregado.

Da mesma forma, a análise comparativa entre os resultados do “check-list” e a presença de *Escherichia coli* nas amostras das águas de irrigação nos levam a interpretações similares às mencionadas acima, entretanto, a horta “cinco”, classificada como “regular” apresentou uma melhor correlação com as análises microbiológicas, ou seja, apenas 40% das amostras contaminadas. Era esperado que as hortas “seis” e “nove” apresentassem um menor percentual de amostras contaminadas já que foram classificadas como “boas” pelo “check-list”.

Na análise comparativa entre os resultados encontrados nas análises microbiológicas das águas de irrigação e das hortaliças, pode-se observar que, de uma forma geral, os maiores índices de contaminação ocorreram nas amostras provindas das hortas “dois” e “três”. Estas

também foram as hortas que obtiveram um maior percentual de amostras da água de irrigação em desacordo com o padrão microbiológico vigente. De acordo com os resultados encontrados pode-se afirmar que provavelmente a água de irrigação teve uma contribuição significativa para a contaminação das hortaliças, corroborando com os resultados apresentados na literatura e já anteriormente mencionados.

#### **5.4 Avaliação da eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli* inoculadas artificialmente em alface**

No presente estudo foi investigada a eficácia de quatro tratamentos sanitizantes sobre duas linhagens de *E. coli* inoculadas artificialmente em folhas de alface cortadas, *Escherichia coli* O157: H7 e *Escherichia coli* isolada de alface, denominada essa última de *Escherichia coli*-Ls. Os tratamentos empregados foram: Tratamento I, vinagre de álcool; tratamento II, suco de limão; tratamento III, mistura do suco de limão e vinagre (1:1) e tratamento IV, mistura do suco de limão, vinagre e água (1:1:1).

Antes de serem empregados os tratamentos mencionados acima, foram determinadas a acidez das soluções e os resultados encontrados foram os seguintes: vinagre de álcool, acidez igual a 4,20% em ácido acético; suco de limão, acidez igual a 3,66% em ácido cítrico; mistura vinagre e suco de limão (1:1), acidez igual a 8,04% em ácido acético e mistura vinagre, suco de limão e água (1:1:1), acidez igual a 5,28% em ácido acético.

Atualmente, o emprego de ácidos orgânicos já é bem estabelecido junto às indústrias de alimentos, atuando como flavorizantes ou conservantes para alimentos. Estudos têm demonstrado o uso das soluções acima sobre linhagens de *Salmonella* spp. e outras bactérias (SEGUN & KARAPINAR, 2004, 2005). Nesse estudo optou-se pela investigação da eficácia desses ácidos orgânicos, provindos de soluções comumente utilizadas na culinária brasileira e de todo o mundo, sobre *Escherichia coli* O157: H7 e sobre *E. coli* isolada de alface (Ls), considerando que *Salmonella* spp. não foram isoladas das amostras das hortaliças investigadas e também devido à *E. coli* O157: H7 ser reconhecida como uma bactéria ácido-resistente.

Na Tabela 11 observa-se o efeito da adição das soluções empregadas sobre a *Escherichia coli* O157: H7 inoculada artificialmente nas amostras de alface. Na análise estatística, utilizando o teste de Duncan, ficou evidenciado que não houve diferença

significativa ao nível de 5% ( $p > 0,05$ ) entre os quatro tratamentos testados. Entretanto, observaram-se variações nas reduções decimais obtidas de acordo com o tratamento, em até 2,2 ciclos logarítmicos. Nos estudos realizados por Sengun & Karapinar (2004, 2005) onde foram testadas as soluções de vinagre e suco de limão e a mistura vinagre e suco de limão (1:1) sobre cepas de *Salmonella* Typhimuriumm, os autores encontraram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (teste de Duncan,  $p > 0,05$ ) e, a mistura do vinagre e suco de limão (1:1) apresentou o melhor desempenho.

**Tabela 11. Eficácia dos tratamentos sobre *Escherichia coli* O157: H7 inoculada artificialmente em folhas de alface, após 15 minutos de contato.**

| Soluções de tratamento           | Acidez   | <i>E. coli</i> O157: H7 | <i>E. coli</i> O157: H7 | Reduções decimais                 |
|----------------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
|                                  |          | (log/ UFC/g)            | (log/ UFC/g)            | (ciclos log) **                   |
|                                  |          | ANTES                   | APÓS                    | RD                                |
| Suco de limão                    | 3,66     | 6,15                    | 3,40                    | 2,75                              |
|                                  | (ácido   | 6,23                    | 3,40                    | 2,83                              |
|                                  | cítrico) | 6,08                    | 5,38                    | 0,70                              |
|                                  |          |                         |                         | Média = 2,09 <sup>a*</sup> ± 1,2  |
| Vinagre                          | 4,20     | 6,15                    | 3,90                    | 2,25                              |
|                                  | (ácido   | 6,23                    | 2,70                    | 3,53                              |
|                                  | acético) | 6,08                    | 3,30                    | 2,78                              |
|                                  |          |                         |                         | Média = 2,85 <sup>a*</sup> ± 0,64 |
| Vinagre + limão (1:1)            | 8,04     | 6,15                    | 3,05                    | 3,05                              |
|                                  | (ácido   | 6,23                    | 2,04                    | 4,19                              |
|                                  | acético) | 6,08                    | 3,56                    | 2,52                              |
|                                  |          |                         |                         | Média = 3,25 <sup>a*</sup> ± 0,84 |
| Vinagre + limão + água (1: 1: 1) | 5,28     | 6,26                    | 4,34                    | 1,92                              |
|                                  | (ácido   | 6,34                    | 5,87                    | 0,47                              |
|                                  | acético) | 6,53                    | 5,76                    | 0,77                              |
|                                  |          |                         |                         | Média = 1,05 <sup>a*</sup> ± 0,76 |

\*números seguidos por letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), ± Desvio padrão

De acordo com a Tabela 11, as maiores reduções decimais obtidas para a cepa de *E. coli* O157: H7 foram decorrentes do tratamento empregando a mistura do vinagre com suco de limão (1:1), com um valor médio igual a 3,25 ciclos logarítmicos, seguido pelo tratamento com o vinagre de álcool, redução média de 2,85 ciclos log, suco de limão, 2,09 ciclos log e apresentando menor eficiência, a mistura vinagre, suco de limão e água (1: 1: 1), redução média de 1,05 ciclos log. Estes resultados foram superiores aos apresentados por Wright et al. (2000) que inocularam artificialmente uma cepa de *Escherichia coli* O157: H7 em maçãs e, após a sanitização da fruta com ácido acético a 5%, obtiveram uma redução máxima de 3,0 ciclos log. Yu et al. (2001) também avaliaram a eficácia do ácido acético a 5% e

hipoclorito de sódio na concentração de 200mg/ L sobre *Escherichia coli* O157: H7 inoculada em morango. Os autores obtiveram reduções de 1,34 ciclos log no emprego do ácido acético e de 1,56 ciclos log no emprego do hipoclorito de sódio. Por outro lado, Entani et al. (1998) encontraram resultados bem superiores, ou seja, utilizando o ácido acético a 2,5%, os autores obtiveram uma redução de 8,0 ciclos log na população de *Escherichia coli* O157: H7, porém os testes foram realizados *in vitro*, ou seja, a bactéria não foi inoculada em amostras de alimentos.

Sengun & Karapinar (2004), em estudo similar, porém utilizando *Salmonella* Typhimurium inoculada em cenouras, verificaram o poder sanitizante dos mesmos tratamentos, exceto mistura vinagre, suco de limão e água, após 15 minutos de exposição. Os autores obtiveram resultados superiores aos nossos para os tratamentos, ou seja: suco de limão, redução de 2,68 ciclos log e mistura vinagre e suco de limão, redução de 4,11 ciclos log. Entretanto, para o tratamento com o vinagre as reduções obtidas no presente estudo foram superiores àquelas obtidas pelos pesquisadores. Em estudo posterior, estes mesmos autores inocularam a *Salmonella* Typhimurium em rúcula e cebola e, após o emprego dos mesmos tratamentos por 15 minutos de contato, obtiveram reduções mais baixas quando se tratava do emprego de suco de limão sobre rúcula (1,7 ciclos log). Em relação ao vinagre, os autores observaram uma redução de 2,12 e 2,97 ciclos log, para rúcula e cebola, respectivamente, e, em relação à mistura vinagre e suco de limão, redução da população em níveis indetectáveis no caso da rúcula e redução de 2,5 ciclos log para a cebola (SEGUN & KARAPINAR, 2005).

Comparando os resultados da literatura mencionados anteriormente com aqueles obtidos no presente estudo, verifica-se que a maior diferença encontrada foi observada utilizando o tratamento da mistura do suco de limão com vinagre, que no estudo de Segun & Karapinar (2005) alcançou valores de Redução Decimal (RD) bastante expressivos, chegando a níveis indetectáveis da bactéria inoculada. Nota-se também que a eficiência dos tratamentos varia de acordo com o tipo de hortaliça inoculada.

Na Tabela 12 observa-se o efeito da adição das mesmas soluções de tratamento sobre a *Escherichia coli*-Ls (isolada de alface – *Lactuca sativa*), inoculada artificialmente nas amostras de alface. De acordo com a análise estatística, os tratamentos também não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si.

Para essa cepa, apesar de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos, o vinagre (acidez igual a 4% em ácido acético) apresentou a maior redução decimal da população bacteriana, com valor médio igual a 1,51 ciclos log. O tratamento com a mistura vinagre e suco de limão veio em seguida com 1,25 ciclos log., seguido pelo suco de limão e mistura vinagre, suco de limão e água, que apresentaram as mais baixas reduções, ou seja, valores médios inferiores a 1 ciclo log (Tabela 12).

**Tabela 12. Eficácia dos tratamentos sobre *Escherichia coli*-Ls inoculada artificialmente em folhas de alface, após 15 minutos de contato.**

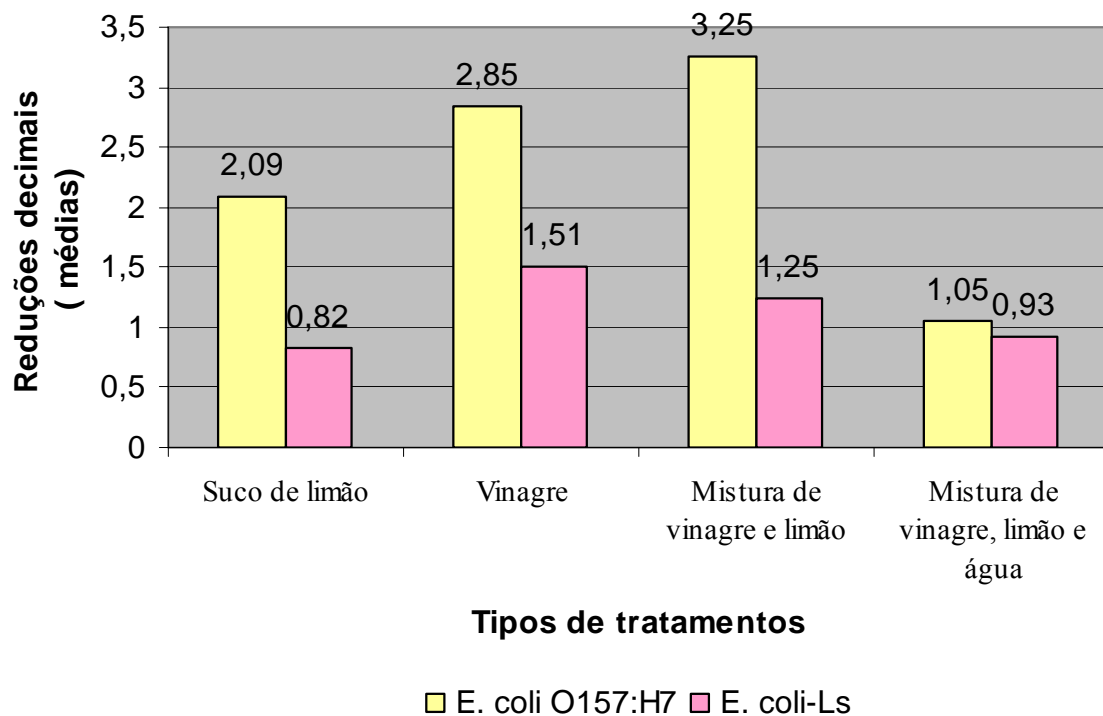
| Soluções de tratamento           | Acidez                  | <i>E. coli</i> -Ls (log/UFC/g) |      | Reduções decimais (ciclos log) RD |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|------|-----------------------------------|
|                                  |                         | ANTES                          | APÓS |                                   |
| Suco de limão                    | 3,66<br>(ácido cítrico) | 6,30                           | 5,46 | 0,84                              |
|                                  |                         | 6,48                           | 5,86 | 0,62                              |
|                                  |                         | 6,67                           | 5,67 | 1,00                              |
|                                  |                         |                                |      | Média = 0,82b* ± 0,19             |
| Vinagre                          | 4,20<br>(ácido acético) | 6,30                           | 5,18 | 1,12                              |
|                                  |                         | 6,48                           | 5,04 | 1,44                              |
|                                  |                         | 6,67                           | 4,70 | 1,97                              |
|                                  |                         |                                |      | Média = 1,51b* ± 0,42             |
| Vinagre + limão (1:1)            | 8,04<br>(ácido acético) | 6,30                           | 5,08 | 1,22                              |
|                                  |                         | 6,48                           | 5,20 | 1,28                              |
|                                  |                         | 6,67                           | 5,43 | 1,24                              |
|                                  |                         |                                |      | Média = 1,25b* ± 0,30             |
| Vinagre + limão + água (1: 1: 1) | 5,28<br>(ácido acético) | 6,30                           | 5,46 | 0,84                              |
|                                  |                         | 6,48                           | 5,79 | 0,69                              |
|                                  |                         | 6,67                           | 5,41 | 1,26                              |
|                                  |                         |                                |      | Média = 0,93b* ± 0,29             |

\*números seguidos por letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), ± Desvio padrão

Observa-se que as maiores reduções da população de *E. coli*-Ls foram obtidas com o emprego do vinagre, seguido da mistura vinagre e suco de limão. Já para a cepa de *Escherichia coli* O157: H7 o melhor tratamento foi a mistura vinagre e suco de limão, seguido do vinagre (Figura 7).

Como se pode observar, as reduções decimais encontradas na população dessa cepa foram bem inferiores comparadas àquelas obtidas para a cepa de *Escherichia coli* O157: H7. Esses resultados não eram esperados, considerando o caráter ácido-resistente da *E. coli* O157: H7 relatado pela literatura, porém esse caráter ácido-resistente somente é observado quando a bactéria já está adaptada ao meio de cultura ou alimento onde ela se encontra inoculada (DOYLE, 1989).

**Figura 7.** Eficácia dos tratamentos sobre *E. coli* O157:H7 e *E. coli* -Ls inoculadas artificialmente em alface



Outros autores encontraram reduções decimais da população bacteriana inferiores àquela encontrada no presente estudo. Assim, Nascimento (2002) avaliando o efeito da ação do ácido acético a 2% e 4% e do vinagre tinto a 6%, 25% e 50% sobre *Escherichia coli* isolada de alface adquirida no comércio varejista de Campinas – SP conseguiu reduzir apenas 0,12 ciclos log, ou seja, 10,7% da população inicial. Eiroa & Porto (1996) verificando a eficiência da solução de vinagre a 6%, também não conseguiram reduzir mais do que um ciclo decimal da população de *Escherichia coli*, apesar da concentração da solução ter sido inferior a utilizada no presente estudo. No entanto, valores mais próximos aos da presente investigação foram demonstrados por Weissinger & Beuchat (2000), ao avaliarem o efeito do ácido acético a 5% em sementes de alfafa inoculadas artificialmente com *Salmonella* spp., ou seja, os autores obtiveram 1,74 ciclos log de redução.

Deve-se considerar também que os vinagres comerciais além do ácido acético contêm também alguns ésteres que além de proporcionar o aroma, podem ter componentes inibitórios (Viajayakumar & Wolf-Hall, 2002), o que provavelmente favoreceu a maior sensibilização demonstrada pela cepa de *E. coli*-Ls submetida a este tratamento.

Outro fato observado no presente estudo foi a menor redução da população microbiana quando no emprego da mistura diluída, a qual apresentava uma acidez de 5,28% em ácido acético, comparada ao vinagre, acidez igual a 4,2%, em ácido acético. Uma explicação plausível para este resultado é que talvez tenha ocorrido um prejuízo no efeito sinérgico do vinagre com o suco de limão na presença da água, o que pode ter afetado a eficácia sanitizante da solução.

Estudo conduzido por Rhee et al. (2003) avaliou o efeito da farinha de mostarda e ácido acético sobre a *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* entérica. Os autores observaram que o efeito bactericida da mostarda adicionada de pequena quantidade de ácido acético (0,5%) foi menor, apesar de ter apresentado uma acidez maior, comparada à maionese, empregada isoladamente com acidez menor, sugerindo entre outras explicações a ocorrência de problemas no sinergismo entre as substâncias.

Através da análise comparativa entre as médias das reduções decimais obtidas nas populações das duas cepas, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as reduções decimais (RD média) obtidas para a cepa de *Escherichia coli* O157: H7 (2,31 ciclos log) e *Escherichia coli*-Ls (1,12 ciclos log).

Dados da literatura relatam que a *Escherichia coli* O157: H7 é conhecida por sua resistência ácida e sobrevida em alimentos com baixo pH (DOYLE, 1989). Como já mencionado anteriormente, neste estudo essa cepa demonstrou uma menor resistência ácida quando comparada à cepa de *Escherichia coli*-Ls. Alguns fatores podem ser apontados para explicar estes resultados. Em primeiro lugar o tempo de exposição da bactéria *Escherichia coli* O157: H7 aos agentes ácidos empregados de apenas 15 minutos, o que provavelmente não tenha sido suficiente para desenvolver nesta bactéria os mecanismos de resistência ácida. Os estudos realizados para verificar a resistência ácida destas bactérias referem-se a um espaço de tempo maior, expresso normalmente em horas.

No caso da *Escherichia coli*-Ls, provavelmente a maior resistência aos tratamentos demonstrada, pode ser decorrente da mesma ter sido originária da própria alface, ou também a exposição da hortaliça de origem a um nível elevado de contaminantes como agrotóxicos e outros produtos químicos, possam ter levado ao desenvolvimento de mecanismos de resistência na bactéria.

Entani et al. (1998), afirmam que na fase estacionária as células de *Escherichia coli*



O157: H7 são significativamente mais ácido-resistentes do que na fase exponencial. Dessa forma, esta também poderia ser uma justificativa, visto que em nosso estudo as bactérias encontravam-se na fase exponencial de crescimento quando foram inoculadas nas folhas de alface.

Outro fator importante que interfere na eficácia da sanitização é a diferença nas características de aderência e formação de biofilme (SINGH et al., 2002). No caso da cepa *Escherichia coli*-Ls, a bactéria provavelmente pode ter se aderido melhor sobre a superfície da hortaliça, visto que a mesma foi obtida da própria alface.

Takeuchi & Frank (2001) estudaram a viabilidade de *Escherichia coli* em diferentes estruturas da folha de alface após o tratamento com solução de cloro 200mg/ L por 5 minutos de contato, e observaram que a maioria das células de *Escherichia coli* (68,3%) que penetraram 30-40 µm no tecido injuriado permaneceram viáveis após o tratamento, enquanto que as células na superfície sobreviveram menos.

Comparando os resultados das reduções decimais obtidas neste estudo para ambas as cepas, com outros estudos que utilizaram compostos clorados como tratamento, constatou-se que os valores para as reduções decimais (RD) foram semelhantes ou superiores aos encontrados. Como exemplo, resultados encontrados por Nascimento (2002), utilizando solução de hipoclorito de sódio a 200 mg/ L sobre vários microrganismos, inclusive *E.coli*, demonstraram valores máximos de RD igual a 2 ciclos log.. Beuchat et al. (1998) ao avaliarem a eficácia do cloro sobre a redução da população de microrganismos aeróbios mesófilos em alface obtiveram também reduções de apenas 2,2 ciclos log.. Fantuzzi et al. (2004) também utilizaram soluções de hipoclorito de sódio a 200 mg/ L e composto orgânico clorado a 200 mg/ L sobre o repolho e observaram uma RD máxima para microrganismos aeróbios mesófilos de 1,8 ciclos log.. Por sua vez, Takeuchi & Frank (2001) ao avaliarem o efeito do hipoclorito de sódio 200 mg/ L por 5 minutos de contato a 22 °C sobre *E.coli* O157: H7 inoculada na superfície intacta e em cortes de folhas de alface, observaram RD iguais a 0,3 e 0,4, respectivamente.

Diante dos dados da literatura apresentados acima e comparando com os resultados desse estudo, observa-se que, apesar de não ter sido encontrado diferença estatisticamente significativa entre as soluções testadas, as reduções decimais obtidas principalmente com os tratamentos empregando a mistura vinagre e suco de limão e o vinagre de álcool apresentaram

resultados similares ou superiores a outros sanitizantes comumente empregados, podendo serem usados como alternativa na sanitização de hortaliças folhosas. Contudo, faz-se necessário a realização de um estudo empregando um maior número de repetições dos experimentos utilizando as mesmas soluções e cepas de *E. coli* para aprofundamento da discussão, além da avaliação da qualidade sensorial dos produtos submetidos a esses tratamentos e estudos de custos, procurando viabilizar em nível industrial e principalmente junto às Unidades de Alimentação e Nutrição (UANs) a utilização dessas soluções.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados e de acordo com as condições em que foi desenvolvido o presente estudo, pode-se concluir que:

- ✓ A maioria das hortas investigadas apresentou um perfil higiênico-sanitário não adequado, necessitando de atenção para promoção de saneamento básico, melhoria das práticas agrícolas, controle da presença de roedores e cães e beneficiamento das áreas sujeitas a alagamento.
- ✓ As condições higiênico-sanitárias deficitárias foram demonstradas também pelos resultados obtidos nas análises microbiológicas das hortaliças, que apontaram elevados percentuais de contaminação por coliformes termotolerantes e presença de *Escherichia coli*, evidenciando-se riscos de transmissão de bactérias patogênicas ao consumidor;
- ✓ As linhagens de *E. coli* isoladas das hortaliças não foram produtoras de citotoxinas, entretanto esse resultado não afasta a possibilidade da presença de cepas patogênicas;
- ✓ Apesar da alta contaminação por coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp. não foi isolada das amostras de hortaliças, atendendo ao padrão microbiológico vigente;
- ✓ Quanto às águas utilizadas para irrigação das hortaliças verificou-se que as mesmas encontravam-se, em sua maioria, impróprias para esta finalidade devido às altas contagens de coliformes totais e termotolerantes e o não atendimento ao padrão microbiológico vigente;
- ✓ Na análise comparativa, verificou-se que as hortaliças e águas de irrigação provenientes de hortas classificadas como boas pelo “check-list”, apresentavam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, demonstrando a necessidade de revisão e validação do formulário usado como “check-list” para estudos futuros;
- ✓ A partir dos resultados encontrados pode-se concluir que embora os estudos da literatura já apontem o problema, as ações pertinentes não vêm sendo adotadas pelas autoridades competentes junto às hortas;

- ✓ Esses resultados apontam a necessidade de intervenção nas hortas por parte dos órgãos competentes visando uma maior atenção ao saneamento básico, controle de vetores, controle higiênico-sanitário da água de irrigação e ações educativas junto aos horticultores para a adoção de procedimentos de boas práticas de produção;
- ✓ O estudo para verificar o desempenho das soluções antimicrobianas utilizadas sobre *Escherichia coli* inoculada artificialmente em alface demonstrou que o mesmo foi influenciado pelo tipo da linhagem bacteriana inoculada no alimento;
- ✓ A linhagem *Escherichia coli*-Ls apresentou maior resistência aos agentes antimicrobianos testados do que a linhagem *Escherichia coli* O157: H7, o que pode ser explicado pelo fato da mesma provir do habitat onde foi posteriormente inoculada;
- ✓ Os tratamentos empregando o vinagre e a mistura vinagre e limão apresentaram as maiores reduções decimais quando comparados às demais soluções antimicrobianas utilizadas nesse estudo;
- ✓ Os tratamentos empregando suco de limão e a mistura vinagre, suco de limão e água resultaram nas menores reduções decimais, embora tenham sido mais eficazes para a cepa *Escherichia coli* O157: H7;
- ✓ O vinagre e a mistura vinagre e suco de limão constituem-se em uma boa alternativa para a sanitização de hortaliças em substituição aos agentes clorados, que vêm apresentando seu uso limitado devido à formação de substâncias carcinogênicas;
- ✓ Faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados utilizando-se as soluções antimicrobianas e as linhagens utilizados nesse estudo para melhor assegurar o comportamento das soluções.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. U.; OLIVEIRA, A. P.; BRUNO, R. L. A.; SADER, R.; ALVES, A. U.. Rendimentos e qualidade fisiológica de sementes de coentro cultivado com adubação orgânica mineral. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 132-137, 2005.

AMÂNCIO, G. C.; PEREIRA, M. L.; CARVALHO, E. P. *Escherichia coli* Enterohemorrágica (E. coli O157: H7). 1 - Algumas considerações epidemiológicas sobre ecossistema, patogênese e controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, p. 65-73, 2003.

AMARAL, L. A.; FILHO NADER, A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista Saúde Pública**, v.37, n. 4, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 16 th. ed. New York, 1992b.

AMORIM, J. R. A. Fatores que afetam a adequabilidade da água para irrigação. **Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura**. São Paulo, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br>>. Acesso em: 10 jun. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC official methods**: 942.15, Fruit and Fruit products. Acidity (titratable). Washington, DC, chapter 37, 2000. p. 20-21.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC official methods**: 96009, germicidal and detergent sanitizing action disinfectants. 16 th. ed. Gaithersburg, 1995. p. 9-11.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC official methods**: 930.35, Spices and Other Condiments. Acidity. (titratable) of Vinegars. Washington, DC, chapter 43. 2000. p. 11-12.

BAHIA, Secretaria Estadual de Saúde. Divisão de Vigilância Sanitária. **Manual de Procedimentos Técnicos em Ações Básicas de Vigilância Sanitária – Formulário de Inspeção em Estabelecimentos da Área de Alimentos**. Salvador-BA, 1996.

BAHIA, Secretaria Municipal de Saúde. Lei nº 5504/99 – Dispõe sobre o Código Municipal de Saúde. **Diário Oficial do Município** de Salvador, 1999.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Revista de Pediatria**, São Paulo, v. 23, p. 320-328, 2001.

BASTOS, R. K. X. Avaliação da contaminação de hortaliças irrigadas com esgotos sanitários. In: CONGRESSO INTERAMERICANO INGENIERIA SANITÁRIA Y AMBIENTAL, 28, 2002, Cancun. **Anais...** México.

BELL, B. P; GOLDOFT, M.; GRIFFIN, P. M. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 – associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgueres. **Journal of American Medic Association**, v. 272, n. 17, p. 1349-1353, 1994.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. Vol. 21, n. 2, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.com.br>>. Acesso em: 20 ago. 2005.

BEUCHAT, L. R. Difficulties in eliminating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **Acta Hort.** (ISHS) 642:151-160. Disponível em: <[http://www.actahort.org/books/642/642\\_17.htm](http://www.actahort.org/books/642/642_17.htm)>.2004

BEUCHAT, L. R.; NAIL, B.V.; ADLER, B. B.; CLAVERO, M. R. S. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1305-1311, 1988.

BEUCHAT, L. R. ; FARBER J.M.; GARRETT E.H.; HARRIS L.J.; PARISH M.E.; SUSLOW T.V.; BUSTA F.F. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1079-1084, jul. 2001.

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

BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GARABAL, J.I.; GONZÁLEZ, E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 96, p.155-160. 1992

BLANCO, J. BLANCO, M.; BLANCO, J; MORA, A.; BALAGUER, L.; MOURIÑO, M., JÚAREZ, A.; JANSEN, W.H. . O serogroups, biotypes and *ele* genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy rabbits. **J. Clin. Microbiol.** V. 34, p.3101-3107, 1996

Brasil, Ministério da Saúde. Lei n. 8080 de 20 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 1990.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa** n. 7/1999. Adubos e condicionadores de solos permitidos, Brasília, DF, 17 mai. 1999.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 12 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 12 jan. 2001a. Disponível em: <<http://www.anvisa.br>>. Acesso em: 10 jun. 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 7 de 02 de janeiro de 2001. Aprovar a extensão de uso Ácido Láctico (INS 270) como coadjuvante de tecnologia, na função de agente de controle de microrganismos na lavagem de ovos, carcaças ou partes de animais de açougue em quantidade suficiente para obter o efeito desejado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 8 jan. 2001b.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Manual de normas e instruções**. 2002. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 20 ago. 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.02 de 08 de janeiro de 2004. Aprova o uso do ácido peracético como coadjuvante de tecnologia na função de agente de controle de microrganismos na lavagem de ovos, carcaças e ou partes de animais de açougue, peixes e crustáceos e hortifrutícolas em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 9 jan. 2004.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Febre tifóide**. Brasília-DF. 2006a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia, Gerência Técnica de Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2006b.

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.

BRUNO, L. M.; QUEIRÓZ, A. A. M.; ANDRADE, A. P. C.; VASCONCELOS, N. M. ; BORGES, M. F. Avaliação microbiológica de hortícolas e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.** v. 23, p. 75-84, jan.-jun. 2005.

BUCK, J. W.; WALCOTT, R. R.; BEUCHAT, L. R. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. **APS Net, Feature Story**. jan.-fev. 2003.

BURNETT, S. L.; BEUCHAT, L. R. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 25, p. 281-287. 2000.

CABRINI, K.; SIVIERO A. R.; HONÓRIO, E. F.; OLIVEIRA, L. F. C.; VENÂNCIO, P. C. T.. Pesquisa de coliformes totais e *E. coli* em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, SP, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p. 92- 94 n. 95. 2002.

CASTILLO, A.; ESCARTIN, E. F. Survival of campylobacter jejuni on sliced watermelon and papaya. **Journal of Food Protection.** v. 57, n. 2, p. 166-168, 1994.

CAVALCANTI, J. S. B. Globalização dos Alimentos e Ruralidade: questões para a agricultura o meio ambiente e a sociedade. **Universidade Federal de Pernambuco**. Recife-PE, 2004. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br>>. Acesso em: 08 de fev. 2005.

CENTRAL DE ABASTECIMENTO S. A. (CEASA). Comercialização hortifrutigranjeiros/ Salvador-BA, período de 2002 a 2005, Salvador-BA, 2005.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVC). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. CIP, CVE, CVS, IAL, IIER, 2002. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água**. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov>>. Acesso em: jul. 2005

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Standard methods, examination of water and wastewater, 20 th. ed. **Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group**. 9221. p. 9.47-9.57, 1988.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução n. 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 mar. 2005.

COSTA, E. A. Vigilância sanitária: defesa e proteção da saúde. **Epidemiologia e Saúde**. 5.ed., São Paulo: MEDSI, p. 327-351, 1999.

CUNHA, M. A.; SILVA, M. R. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde e Ambiente em Revista**, jan., 2006.

DESTRO, M. T. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Atheneu, 1996, p.155.

DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989.

DUNNICK, J. K.; MELNICK R. L. Assessment of the carcinogenic potential of chlorinated water: experimental studies of chlorine, chloramine, and trihalomethanes. **J Natl Cancer Inst**. Mai.v. 19, p. 817-822. 1993

EIROA, M. N.; PORTO, E. Avaliação de diferentes desinfetantes a base de cloro e vinagre contra *Vibrio cholerae* presente em alface. **Colet. Inst. Tecnol. Alimentos**; v. 25, n.2, p.169-72. 1995.

\_\_\_\_\_. Efeito da ação de diferentes tipos de vinagres e do hipoclorito de sódio na sobrevivência de *Vibrio cholerae* em folhas de alface contaminadas e sobre a microbiota natural. **Col. Ital**, v. 26, n. 2, p. 199-207, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **A segurança de frutas e hortaliças frescas**, Petrolina - PE, 2001a.

\_\_\_\_\_. **Melhoria da Qualidade e Segurança de Frutas e Verduras Frescas: Curso para Multiplicadores**, Petrolina - PE, 2001b.

\_\_\_\_\_. **EMBRAPA Hortaliças**. Brasília - DF, 2006.

ENTANI, E.; ASAI, M.; TSUKAMOTO, Y.; OHTA, M. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 8, p.953-959. 1998. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&list\\_uids=9713753&dopt=Citation](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&list_uids=9713753&dopt=Citation)>.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M. C. D. A Sanitização. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, P. 207-211, abr.-jun. 2004.



FARACHE FILHO, A.; TAROMARU, P. H.; FUMAGALI, M.V.; REZENDE, A. DUQUE, J. G.; ALCÂNTARA, I. L.; MAGLIO, G. C. **Qualidade sanitária de águas de irrigação de hortas em municípios da Direção Regional de Saúde de Araraquara**. Universidade Estadual de São Paulo, 2001.

FARIA, J. A. .; SILVA, A. A.; FARIA, M. S. C.; SILVA, M. P.; BRITO, M. A. S. . Estudo de alguns aspectos de disseminação de enteroparasitas na cidade de Salvador-BA: estudo da poluição de águas de irrigação de hortas por cistos e ovos de enteroparasitas. **Revista Baiana de Saúde Pública**, mar. 1997. Disponível em: <<http://bases.bireme.br>>. Acesso em: 03 jan. 2005.

FARIAS, E. W. C. **Pesquisa de oocistos *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em água de esgoto e água de córrego da cidade de São Paulo**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FENG, P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infections and emergence of phenotypic variantes. **Emerging Infectious Diseases**, v.1, n.2, p.1-9. 1995. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/feng.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2006.

FERRARIS, M.; CHIESARA, E.; RADICE S.; GIOVARA A.; FRIGERIO S.; FUMAGALLI R.; MARABINI L. Study of potential toxic effects on rainbow trout hepatocytes of surface water treated with chlorine or alternative disinfectants. **Chemosphere**, jun, v. 60, n.1, p.65-73. 2005.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A.; GOMES, M. A. F.; FERREIRA, C. J. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guairá. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 659-662, mai. 2002.

FLOWERS, R. S.; D'AUGUST, J.; ANDREWS, W. H; BAILEY, J.S. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3 rd. ed., p. 371- 430, APHA, Washington, 1992.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Department of Agriculture. Centers for Disease Control and prevention. **Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables**. 1998. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 15 jul. 2005.

\_\_\_\_\_. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. **Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce**. Set. 2001.

\_\_\_\_\_. ***Escherichia coli* O157:H7**. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 2006a. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

\_\_\_\_\_. ***Escherichia coli* O157:H7**. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Atlanta, USA, 2006b Disponível em <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

\_\_\_\_\_. **Statement on Foodborne *E. coli* O157:H7 Outbreak in Spinach**. 2006c. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Disponível em <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

\_\_\_\_\_. *Salmonella* spp. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 2006d. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov>>. Acesso em: 11 jan. 2006.

\_\_\_\_\_. **Salmonellosis**. Coordinating Center for Infectious Diseases / Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Atlanta, USA, 2006e. Acesso em: 11 jan. 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Atheneu, 1996, p.50-60.

GINESTE, D. M. **Um estudo diagnóstico do consumo de água pela irrigação na bacia do Rio Miringuava, região metropolitana de Curitiba-PR**. 2004. Monografia. (Curso de Engenharia Ambiental) - Centro de Ciências Exatas de Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba, 2004.

GUINÉE, P. A. M.; AGTERBERG, C. M.; JANSEN, W. H. Escherichia coli O Antigen typing by means of a mechanized microtechnique. *Appl. Microbiol.*, v. 24, p. 127-131, 1972.

HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A.; TODD, E. C. D. Coliforms *E. Coli* and its toxins. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3 rd. ed., p. 325-369, APHA, Washington, 1992.

JANISIEWICZ, W. J.; CONWAY, W. S.; BROWN, M. W.; SAPERS, G. M.; FRATAMICO, P.; BUCHANAN, R. L. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit lies. **Appl. Microbiol.** v. 65, p. 1-5, 1999.

KOBAYASHI, H.; JAYKUS L.A.; MOLL D.; MARTINEZ M.C.; ANCISO J.; MORA B.; MOE C.L. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 484-489, 2001.

LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 27-31.

LEITÃO, M. F. F.; MONTEIRO FILHO, E.; DELAZARI, I.; ANGELUCCI. Eficiência de sanitizantes na redução da contaminação bacteriana da alface. **Boletim Ital**, v. 18, n. 2, p. 201-226, 1981.

LEITE, A. I. **Prevalência da contaminação e avaliação dos fatores de risco para enteroparasitas em hortaliças de Fortaleza-CE**. 2000. 96 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LOPES, M. C.; SILVA, M. C. A.; ANDREOLLA M.V. R.; BRAGA, G. C.; UNFRIED, J. **Análise microbiológica de hortaliças oriundas de sistemas de produção orgânica e convencional comercializadas em Marechal Cândido Rondon-PR**. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br>>. Acesso em: 31 jan. 2005.

LUENGO, R. F. A.; LANA, M. N. Processamento mínimo de hortaliças. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, out., 2007.

MACEDO, J. A. B.; ANDRADE, N. J.; ARAÚJO, J. M. A.; CHAVES, J. B. P.; SILVA, M. T. C.; JORDÃO, C. P. Cloraminas orgânicas uma solução para evitar a formação de

trihalometanos no processo de desinfecção de águas para abastecimento público. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 90-91, p. 93-103, 2001.

MARCH, S. B.; RATNAM, S. Sorbitol MacConkey Medium for detection of *Escherichia coli* O157: H7 associated with haemorrhagic colits. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.869-872, 1986.

MARQUES, R. G. **Ocorrência de coliformes e salmonella em águas de irrigação de hortaliças nos municípios de Goiânia, Goiás**. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás.

MATOS, K. M. C. **Viabilidade da irrigação com água contaminada por esgoto doméstico na produção de hortaliças**. 2003. 151 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

MELO, N. G. D. O.; JUSTO, A. M.; LIMA, A. A. F.; LIRA, N. S. **Perfil epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos - Recife-PE, 2000-2001**. 2001. Disponível em: <<http://www.equalis.com.br/artigos/perfil.doc>>. Acesso em: 02 abr. 2005.

MESSER, J. W.; MIOURA, T. F.; PEELER, J. M. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3 rd. ed., p. 25-49, APHA, Washington, 1992.

MORETTI, C. L. Boas práticas agrícolas para produção de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, jul. 2003.

MOROUELLI, W. A.; SILVA, H. R. Aspectos sanitários da água para fins de irrigação. **Comunicado Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, mai. 1998.

NASCIMENTO, A. R.; FILHO MOUCHREK, J. E.; BAYMA, A. B.; MARQUES, C. M.P. Sanitização de saladas “in natura” oferecidas em restaurantes *self-service* de São Luis - MA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 16, p. 92-93, 2002.

NASCIMENTO, L. C.; FILHO MOUCHREK, J. E.; BAYMA, A. B.; MARQUES, C. M.P. Uso de derivados clorados, ozônio e ultra-som na sanificação de água e alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n.136, p. 48-57, 2005.

NASCIMENTO, M. S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e hortaliças**. 2002. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

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, jan.-jun. 2003.

NOGUEIRA, M. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de hortaliças produzidas e da água de irrigação e lavagem em hortas da cidade de Jaboticabal**. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo-SP. **Revista de Saúde Pública**, v.26, n. 4, 1992. Disponível em: <[http:// www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 03 jan.2005.

OLIVEIRA, C. A. L.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Qualidade das hortaliças. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 129-133.

OLIVEIRA, I. M.; JUNQUEIRA, A. M. R. **Aspectos da contaminação microbiológica em hortaliças**. Universidade de Brasília, Faculdade de agronomia e Medicina Veterinária, Núcleo de Apoio à Competitividade e Sustentabilidade da Agricultura, 2005. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/default.asp?id=3447>>. Acesso em: 02 mai. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Evaluacion de los servicios de água potable y saneamiento en las Américas. **Relação dos serviços de água e saneamento com a saúde, ambiente, e desenvolvimento econômico e social**. 2000. <<http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/eva2000/brasil/informe/inf-07.htm>>. Acesso em: 05 jun. 2006.

\_\_\_\_\_. **Reunião interamericana, a nível ministerial, sobre saúde e agricultura. proposta de plano de ação do instituto pan-americano de proteção dos alimentos e zoonoses (INPPAZ)**, 13. Washington, Dc, 24 a 25 de abril de 2003.

\_\_\_\_\_. **Estratégia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor**. 2002. Departamento de inocuidad de los alimentos. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety>>. Acesso em: 04 mai. 2006

\_\_\_\_\_. **Guias para la calidade del água potable**. Recomendaciones, Ginebra. 2.ed., v. 1, 1995. 189 p.

\_\_\_\_\_. Vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos y sistemas de alerta en materia de inocuidad de los alimentos. Foro mundial fao/oms de autoridades de reglamentación sobre inocuidad de los alimentos, 2., 12-14 de out. de 2004, Bangkok, Tailândia. **Anais...** Bangkok, Tailândia, 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Água e saúde**. Mai. 2001. Disponível em: <<http://www.opas.org.br>>. Acesso em: jun. 2005.

PACHECO, M. A. A. R. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes Comercializados na CEAGESP de Sorocaba-SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 50-55, 2002.

PALÚ, A. P.; TIBANA, A.; TEIXEIRA, L. M.; LEMOS, M. M. A.; PYRRHO, A. S.; LOPES, H. R. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, servidas em restaurantes *self-service* privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p.67-74, set. 2002.

PAULUS, D.; MEDEIROS, S. L. P.; SANTOS, O. S.; FABBRIN, E. G.; PAULUS, E. Substratos na produção hidropônica de mudas de hortelã. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, 2005.. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 03 jan. 2006.

RANTHUM, M. A. **Subnotificação e alta incidência de doenças veiculadas por alimentos e seus fatores de risco**: causas e conseqüências no município de Ponta Grossa - PR. 2002. 97 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

RHEE, M. S.; LEE, S. Y. DOUGHERTY, R. H., KANG, D. H. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 5, p. 2959-2963, 2003.

RIBEIRO, Á.; GUERRA, R. M. S. N. C.; COSTA, F. N.; ALVES, L. M. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de alfaces e águas de irrigação de hortas da Ilha de São Luís - Ma. **Revista de Higiene Alimentar**, v. 19, n. 130, 2005.

RIVERA, I. N. G.; MARTINS, M. T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Revista Ciências Farmacêuticas**, n. 17, p. 115-136, 1996.

ROSA, C. C. B.; MARTINS, M. L. L.; FOLLY, M. M. Avaliação microbiológica de hortaliças provenientes de hortas comunitárias de Campos dos Goytacazes - RJ / Microbiological evaluation of communitarian vegetables proceeding from Campos dos Goytacazes - RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 75-80, 2005.

SALVADOI, M. R.; COLLETA, H. H. M. D.; YANO, T. Produção de citotoxinas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1997, **Anais...** p. 28.

SANTANA A.; AZEVEDO, D. P.; COSTA, M.; MACEDO, V. Análise de perigo no processamento mínimo de vegetais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, 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.. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acesso em: dez. 2006.

SEGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella* Typhimurium on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). **Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2005.

\_\_\_\_\_. Effectiveness o lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella* Typhimurium on carrots (*Daucus carota* L.). **Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 301-305, 2004.

SILVA, C. G. M.; ANDRADE, S. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Ocorrência de *Cryptosporidium spp.* e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Ciência Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, set./dez. 2005.

SILVA, J. A.; SOARES, L. F.; COSTA, E. L. Sanitização de carcaças de frango com soluções de ácidos orgânicos comerciais e suco de limão. **Revista Tec. Carnes**. Campinas, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2001.

SILVA Jr., E. O. Vias de transmissão. In: **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 13-14.

SILVA, L. J. A Epidemiologia das infecções de origem alimentar. **Revista CIP**, 1998, n. 1. Disponível em: <<http://www.cip.saude.sp.gov.br/numero1>>.

SILVA, N. SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *E. coli* O157: H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência Tecnologia Alimentação**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SIMÕES, M.; PISANI, B.; MARQUES, E. G. L.; PARANDI, M. A. G.; MARTINI, M. H.; CHIARINI, P. F. T.; ANTUNES, J. L. F.; NOGUEIRA, A. P. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality Campinas - SP. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 331-333, 2001.

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, R. L. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce. **Food Microbiology**, v. 19, n. 2-3, p. 183-193, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA. Hortaliças: contaminação por parasitos entéricos. **Sociedade Brasileira de Parasitologia**, 2005. Disponível em: <<http://www.parasitologia.org.br/noticia.php?id=252>>. Acesso em: 10 out. 2006

SOLOMON, E. B; POTENSKI, C. J.; MATTHEWS, K. R. Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.4, p. 673-6, 2002.

SONAE DISTRIBUIÇÃO BRASIL S.A. Clube dos Produtores. **Relatório de vitorias “Clube dos Produtores”**. Porto Alegre, 2005.

SOUSA, C. L.; PEIXOTO, M. R. S.; NEVES, E. C. A.; NASSAR, R. N. Avaliação microbiológica de sucos e néctares de frutas comercializados por uma indústria na cidade de Belém-PA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, p. 43-7, jun. 2002.

SOUSA, J. T.; CEBALLOS, B. S. O.; HENRIQUE, I. N.; DANTAS, J. P.; LIMA, S. M. S. Reuso de água residuária na produção de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.**, Campina Grande, v.10, n. 1, 2006.

SOUTO, R. A. **Avaliação sanitária da água de irrigação e de alfaces (*lactuca sativa* L.) produzida no município de Lagoa Seca, Paraíba**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba.

STEELE, M.; ODUMERU, J. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2839-49, 2004.

TAKAYANAGUI, O. M.; CAPUANO, D. M., OLIVEIRA, C. A. D., BERGAMINI, A. M. M., OKINO, M. H. T., CASTRO SILVA, A. A. M. C., OLIVEIRA, M. A., RIBEIRO, E. G. A., TAKAYANAGUI, A. M. M.. Análise da cadeia de produção de verduras em Ribeirão Preto - SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 224-226, 2006.

TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. H. P.; BERGAMINI, A. N.; OKINO, M. H.T.; CASTRO, A. M. C. S. SANTIAGO, R. C.; DIVANI, M.; OLIVEIRA, M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.. Fiscalização de hortas produtoras de verduras no município de Ribeirão Preto - SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.2, p. 169-174, 2000.

TAKAYANAGUI, O. M.; OLIVEIRA, C. D.; BERGAMINI, A. M. M., CAPUANO, D. M., OKINO, M. H. T., FEBRÔNIO, L. H. P., CASTRO SILVA, A. A. M. C. , OLIVEIRA, E. G. A. R., TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto - SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n. 1, 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.

TAPIA DAZA, M. S.; DIAZ, R. V. Ecological and food safety considerations about products of vegetable origin. **Arch Latinoam Nutr.**, v. 44, n.4, p. 232-41, 1994.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. **Emerging Infectious Diseases**, Georgia, USA, v. 3, n. 4, out.-dez. 1997.

TAVECHIO, A.; YONAMINE E. K.; GHILARD, A. C. R.; DO VALLE, G. R. F.; ARRUDA, A. C.; IRINO, K.; FERNANDES, S. A.T. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 38, p. 315-322, 1996.

TRANI, P. E.; TIVELLI, S. W.; PURQUERIO, L. F. P.; AZEVEDO FILHO, J. A. Instituto Agrônômico (IAC). **Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura**. 2005. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Alface/Alface.htm>>. Acesso em: 02 mai. 2005.

VALSECHI, O. A. Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural. Microbiologia dos Alimentos. **Alimentos e Microrganismos**. Araras, São Paulo, 2006.

VIJAYAKUMAR, C.; HALL, W. Minimum bacteriostatic and bactericidal concentrations of household sanitizers for *Escherichia coli* strains in tryptic soy broth. **Food Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 383-388, 2002

WEAGANT, S. D; BRYANT, J. L; JINNEMN, K. G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 7-12, 1995.

WEISSINGER, W. R.; BEUCHAT, L. R. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate *Salmonella* on alfafa seeds. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 6, p. 1475-1482, 2000.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 20 jul. 2005.

WRIGHT, J. R.; SUMMER, S. S.; HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D.; ZOECKLEIN, B. W. Reduction of *E. coli* O157: H7 counts on whole fresh apples by treatment with sanitizers. **Dairy Food Environ. Sanit.**, v. 20, n. 2, p. 120-126, 2000.

YU, G.; NEWMAN, M. C.; ARCHBOLD, D. D.; HAMILTON-KEMP, T. R. Survival of *E. coli* O157: H7 on strawberry fruit and reduction of the pathogen population by chemical agents. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 9, p. 1334-1340, 2001



## APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Valores mínimos e máximos do Número Mais Provável (NMP)/ g de coliformes termotolerantes em hortaliças cultivadas em hortas do DSCB de Salvador – Ba

| Amostras | Horta 2 |         |       |         | Horta 3 |         |       |         | Horta 5 |         |       |         | Horta 6 |         |       |         | Horta 9 |         |       |         |
|----------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
|          | Alface  | Coentro | Couve | Hortelã | Alface  | Coentro | Couve | Hortelã | Alface  | Coentro | Couve | Hortelã | Alface  | Coentro | Couve | Hortelã | Alface  | Coentro | Couve | Hortelã |
| 1        | 110     | 1100    | 46    | 110     | 110     | 9,3     | 4,3   | 1500    | 1500    | 430     | 40    | 1500    | 1100    | 1100    | 9,3   | 460     | 430     | 430     | < 0,3 | 70      |
| 2        | 1100    | 1100    | 0,9   | 2,3     | 24      | 46      | 0,9   | < 0,3   | 1100    | 1100    | < 0,3 | 93      | 28      | 460     | 15    | 1100    | < 0,3   | 150     | 4     | 1100    |
| 3        | 1100    | 1100    | < 0,3 | 24      | 24      | 7,5     | 0,9   | 1100    | 28      | 4       | 9     | < 0,3   | 1500    | 240     | < 0,3 | 1100    | 43      | 1100    | < 0,3 | < 0,3   |
| 4        | 1100    | 1100    | 1100  | 1100    | 1500    | 1500    | 2,3   | 24      | < 0,3   | 1100    | 96    | < 0,3   | < 0,3   | 23      | < 0,3 | 1500    | 240     | 4       | < 0,3 | 4       |
| 5        | 1100    | 1500    | 0,9   | 1500    | 15      | 2,3     | < 0,3 | 110     | 0,4     | 110     | < 0,3 | 24      | 2,3     | < 0,3   | 110   | < 0,3   | 0,4     | 0,4     | < 0,3 | 0,4     |
| 6        | 1500    | 110     | 2,3   | < 0,3   | 24      | 110     | < 0,3 | 1500    | 1,5     | 46      | < 0,3 | 2,1     | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | < 0,3   | 110     | 110   | 4,3     |
| 7        | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | 110     | 110     | 7,5   | 110     | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | 110     | 110     | 110   | 110     |
| 8        | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | 0,4     | 110     | 2,3   | 2,3     | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | 0,9     | 2,3     | < 0,3 | 2,1     |
| 9        | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | 110     | 110     | 110   | 110     | N.R.    | N.R.    | N.R.  | N.R.    | 110     | < 0,3   | 46    | 21      |

N.R.= Não realizado

**APÊNDICE B.** Determinação dos valores mínimos e máximos do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes em águas de irrigação, utilizadas em hortas do DSCB de Salvador - Ba.

| <i>ÁMOSTRAS</i> | <i>HORTA 2</i> |              | <i>HORTA 3</i> |              | <i>HORTA 5</i> |              | <i>HORTA 6</i> |              | <i>HORTA 9</i> |              |
|-----------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
|                 | Colif. totais  | Colif. term. | Colif. totais  | Colif. term. | Colif. totais  | Colif. term. | Colif. totais  | Colif. term. | Colif. totais  | Colif. term. |
| I               | >1600          | >1600        | >1600          | >1600        | 30             | < 2,0        | >1600          | >1600        | >1600          | >1600        |
| II              | ≥1600          | ≥1600        | >1600          | >1600        | > 1600         | 30           | < 2,2          | <2,2         | >1600          | >1600        |
| III             | >1600          | >1600        | >1600          | >1600        | >1600          | 4,0          | < 2,2          | <2,2         | >1600          | >1600        |
| IV              | ≥1600          | ≥1600        | 1600           | 1600         | >1600          | 7,0          | 900            | 900          | >1600          | >1600        |
| V               | ≥1600          | ≥1600        | ≥1600          | ≥1600        | 900            | 500          | 240            | 240          | >1600          | >1600        |
| VI              | ≥1600          | ≥1600        | ≥1600          | ≥1600        | 1600           | 1600         | < 2,2          | < 2,2        | N.A            | N.A          |
| VII             | ≥1600          | ≥1600        | 500            | 240          | >1600          | 4,0          | ≥1600          | ≥1600        | N. A.          | N.A          |
| VIII            | 30             | 30           | 300            | 300          | >1600          | 7,0          | < 2,2          | < 2,2        | N.A            | N.A          |
| IX              | >1600          | >1600        | 900            | 900          | >1600          | 7,0          | ≥1600          | ≥1600        | N.A            | N.A          |
| X               | >1600          | >1600        | 900            | 900          | >1600          | 4,0          | < 2,2          | < 2,2        | N.A            | N.A          |

N.A. = Não analisada

**APÊNDICE C.** Confirmação das cepas de *E. Coli* O157: H7 isoladas nos experimentos após os tratamentos e no controle.

| <i>EXP/ COD</i> | <i>TRATAMENTO</i> | <i>TESTE CEL.</i><br><i>VERO</i> | <i>SOROTIPO: O157</i> |
|-----------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------|
| I/13            | MISTURA           | +                                | +                     |
| I/14            | LIMÃO             | +                                | +                     |
| II/15           | LIMÃO             | +                                | +                     |
| II/16           | VINAGRE           | +                                | +                     |
| III/17          | LIMÃO             | +                                | +                     |
| III/18          | MISTURA           | +                                | +                     |
| IV/19           | MIST. DIL.        | +                                | +                     |
| IV/20           | CONTROLE          | +                                | +                     |
| V/21            | LIMÃO             | +                                | +                     |
| V/22            | MIST. DIL.        | +                                | +                     |
| VI/23           | MIST. DIL.        | +                                | +                     |
| <b>VI/24</b>    | CONTROLE          | +                                | +                     |

**APÊNDICE D.** Pesquisa de citotoxinas em cepas de *E. Coli* isoladas de hortaliças

| <b><i>CÓDIGO</i></b> | <b><i>TIPO DE<br/>HORTALIÇA</i></b> | <b><i>LOCAL DE<br/>ORIGEM</i></b> | <b><i>TESTE CEL.<br/>VERO</i></b> |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| A                    | Coentro                             | Horta 5                           | -                                 |
| B                    | Coentro                             | Horta 5                           | -                                 |
| C                    | Hortelã                             | Horta 2                           | -                                 |
| D                    | Coentro                             | Horta 9                           | -                                 |
| E                    | Couve                               | Horta 9                           | -                                 |
| F                    | Couve                               | Horta 5                           | -                                 |
| G                    | Coentro                             | Horta 5                           | -                                 |
| H                    | Hortelã                             | Horta 9                           | -                                 |
| I                    | Coentro                             | Horta 5                           | -                                 |
| J                    | Hortelã                             | Horta 3                           | -                                 |
| K                    | Alface                              | Horta 9                           | -                                 |
| L                    | Hortelã                             | Horta 5                           | -                                 |
| M                    | Coentro                             | Horta 2                           | -                                 |
| N                    | Coentro                             | Horta 5                           | -                                 |
| O                    | Hortelã                             | Horta 3                           | -                                 |
| P                    | Alface                              | Horta 5                           | -                                 |
| Q                    | Hortelã                             | Horta 5                           | -                                 |
| R                    | Alface                              | Horta 9                           | -                                 |
| S                    | Coentro                             | Horta 9                           | -                                 |
| T                    | Alface                              | Horta 3                           | -                                 |

**APÊNDICE E.** Formulário padronizado para investigação da qualidade higiênico-sanitária de hortas (“check-list”).

## **PARTE I: Identificação**

Horta no.:

Localização:

Tempo de existência da horta:

Informações sobre o proprietário:

Nome:

Naturalidade:

Escolaridade:

Número de empregados:

Área cultivada:

Tipo de cultivo:

Produção estimada das hortaliças cultivadas:

Destino do cultivo:

## **PARTE II: INVESTIGAÇÃO**

Bloco 1

Situação e condições da área

1-1 Localização adequada: área livre de focos de insalubridade; ausência de lixo disposto de modo irregular, objetos em desuso e animais vadios e roedores. [2,0]

1-2 Áreas definidas: Local de armazenamento após a colheita, com área limpa, bem ventilada, presença de estrados para armazenamento, área coberta. [0,5]

1-3 Áreas sujeitas à alagamento. [0,5]

1-4 Presença de esgoto a céu aberto. [2,0]

1-5 Instalações sanitárias: Em perfeitas condições de uso. [0,5]

1-6 Abastecimento de água: Água potável\*, com volume adequado e distribuição regular; água bruta com qualidade própria para o destino.

\* De acordo com os padrões para água de irrigação [2,0]

1-7 Uso de Adubo: Produto registrado, manipulação adequada. [1,0]

## Bloco 2

### 2- Manipuladores

2-1 Estado de saúde dos trabalhadores: ASO; visitou o médico nos últimos 06 meses; apresentando diarreia ou ferimentos nas mãos. [1,5]

Total de pontos: 10

#### Classificação:

Excelente: 10,0 - 9,0

Boa: 8,9 - 7,0

Regular: 6,9 - 5,0

Ruim: 4,9 - 3,0

Péssima: 2,9 - 0,0

## **ANEXOS**



## b) Formulário de Inspeção em Feira-Livre (Infra-Estrutura)

Data: \_\_\_\_\_

| PARTE A - IDENTIFICAÇÃO/CADASTRO                 |  |
|--|--|
| 1. Denominação (se houver):                      | _____  |
| 2. Localização:                                  |  |
| 2.1. Rua/Praça/Av.:                              | _____  |
| 2.2. Bairro:                                     | _____  |
| 2.3. Código do Local:                            | _____  |
| 2.4. Município:                                  | _____  |
| 2.5. DIRES:                                      | _____  |
| 3. Tipo:   | <input type="checkbox"/> Fixa <input type="checkbox"/> Móvel <input type="checkbox"/> Eventual |
| 4. Dia(s) da Semana/Horário(s) de Funcionamento: |  |
| ➤ Segunda-feira:                                 | das _____ às _____ horas   |
| ➤ Terça-feira:                                   | das _____ às _____ horas   |
| ➤ Quarta-feira:                                  | das _____ às _____ horas   |
| ➤ Quinta-feira:                                  | das _____ às _____ horas   |
| ➤ Sexta-feira:                                   | das _____ às _____ horas   |
| ➤ Sábado:  | das _____ às _____ horas   |
| ➤ Domingo:                                       | das _____ às _____ horas   |
| ➤ Todos os dias:                                 | das _____ às _____ horas   |
| 5. Órgão Responsável:                            | _____  |
| 6. Responsável/Coordenador da Área:              |  |
| 6.1. Nome Completo:                              | _____  |
| 6.2. Cargo/Função:                               | _____  |
| 6.3. Documento de Identidade Nº:                 | _____ Tipo: _____  |
| Horário da Inspeção: Início:                     | ____/____/____ Término: ____/____/____   |

| PARTE-B AVALIAÇÃO                                   |  |               |
|---|--|---------------|
| Item/ Questão                                       | Descrição  | Pontuação S N |
| 1   | <b>SITUAÇÃO E CONDIÇÕES DA ÁREA</b>  |               |
| 1.1   | Localização adequada: área livre de focos insalubres. Ausência de lixo disposto de modo irregular. Ausência de objetos em desuso. Ausência de animais vadios, insetos e roedores, na área de comercialização e vizinhança. Ausência de veículos de transporte (tração animal ou motor), trafegando ou estacionados na área de comercialização. | [10] [0]      |
| 1.2   | Áreas definidas: Boxes, bancas e barracas agrupadas de acordo com o tipo de produto comercializado. Área de estacionamento de veículos e animais isolada das áreas de depósito e comercialização   | [12] [0]      |
| 1.3   | Iluminação adequada, com instalações em bom estado de conservação.   | [3] [0]       |
| 1.4   | Piso da área, em bom estado de conservação. Sistema de esgoto com pontos de escoamento provido de grades protetoras em perfeito funcionamento ou valas com declividade adequada e em perfeito funcionamento.   | [8] [0]       |
| 1.5   | Instalações sanitárias públicas (fixas ou móveis):   | [6] [0]       |
| 1.5.1   | Separadas por sexo, com vasos sanitários e mictórios em quantidade compatível com a capacidade instalada da feira. Em bom estado de conservação.   | [8] [0]       |
| 1.5.2   | Em perfeitas condições de higiene e limpeza.   |               |
| 1.6   | Abastecimento de água:   | [10] [0]      |
| 1.6.1   | Água potável, com volume adequado e pontos de fornecimento distribuídos uniformemente por toda a área.   |               |
| 1.6.2   | Modo de distribuição em perfeitas condições de higiene sem interferência negativa na comercialização dos produtos.   | [13] [0]      |
| 1.7   | Destino dos resíduos:  | [10] [0]      |
| 1.7.1   | Varição e coleta na área de comercialização, em condições adequadas ao tempo e volume em que são produzidos, não permitindo acúmulo.   |               |
| 1.7.2   | Depósito geral com capacidade adequada ao volume produzido, instalado em local de fácil acesso, sem interferência negativa no funcionamento da feira e nos produtos expostos à comercialização.  | [10] [0]      |
| 1.7.3   | Coleta geral periódica, adequada à manutenção da higiene do local de realização da feira. Sem interferência negativa à comercialização dos produtos.   | [10] [0]      |
| TOTAL _____<br>TS = Somatório das notas sim obtidas |  | ( _____ )     |

**PARTE C - RELATO**

Pontuação do Estabelecimento (PE):

Qualificação: [ ] Excelente [ ] Bom [ ] Regular [ ] Deficiente

Previsão de retorno: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pessoas Contactadas (Nome/Função):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Informações Complementares:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Providências Tomadas :

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Parecer Final :

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Equipe de inspeção:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**RELATÓRIO VISTORIAS**  
**"CLUBE DOS PRODUTORES"**

"Check List"

Nome do Produtor:

Local:

Data da Vistoria:

|                                |                            |                                |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <b>Legenda Notas:</b>          | Nota 1<br>(Insatisfatório) | Nota 2<br>(Necessita corrigir) |
| Nota 3<br>(Necessita melhorar) | Nota 4<br>(Satisfatório)   | Nota 5<br>(Excelente)          |

| TÓPICOS VISTORIADOS   | NOTA | OBSERVAÇÕES DO VISTORIADOR |
|---|------|----------------------------|
| Existe facilidade na identificação da origem dos produtos, para efeito da rastreabilidade.  |      |                            |
| Organização da propriedade como um todo (limpeza da sede, barracão ou packing house, agroindústria, estradas, lavoura...)                               |      |                            |
| Organização e limpeza do local de lavagem, higienização e embalagem dos produtos.   |      |                            |
| A qualidade da água do barracão / packing house ou agroindústria, está adequada a sua utilização? A análise deverá ser semestral.                       |      |                            |
| Existe banheiro / vestiário junto a estas instalações e como apresenta-se quanto a organização e higiene?   |      |                            |
| As pessoas envolvidas no barracão / packing house ou agroindústria utilizam uniforme adequado e apresenta-se higiênicos?                                |      |                            |
| As pessoas envolvidas no barracão / packing house ou agroindústria recebem instruções básica de higiene para manuseio dos produtos frescos.             |      |                            |
| Como apresentam-se as embalagens de uso interno (Caixas) quanto a higiene?  |      |                            |
| A água utilizada na irrigação é de boa fonte e qualidade?   |      |                            |
| Existe procedimento de controle de qualidade que garanta que os produtos estejam sempre dentro dos padrões da Ficha Técnica.                            |      |                            |
| Os procedimentos de marcação dos produtos com o Selo "Clube dos Produtores", tanto para entregas no CD, quanto Lojas, estão corretos?                   |      |                            |
| Os procedimentos de identificação das caixas (nome, local e data), estão corretos?  |      |                            |
| Existe o emprego de alguma técnica de monitoramento de pragas e doenças, visando a redução ao máximo no uso de defensivos agrícolas (Manejo Integrado)? |      |                            |
| Para produto animal, o produtor lança mão de técnicas que minimizem o uso de medicamentos químicos comuns?  |      |                            |

**RELATÓRIO VISTORIAS**  
**"CLUBE DOS PRODUTORES"**

"Check List"

**Nome do Produtor:**

**Local:**

**Data da Vistoria:**

|                                       |                                   |                                       |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Legenda Notas:</b>                 | <b>Nota 1</b><br>(Insatisfatório) | <b>Nota 2</b><br>(Necessita corrigir) |
| <b>Nota 3</b><br>(Necessita melhorar) | <b>Nota 4</b><br>(Satisfatório)   | <b>Nota 5</b><br>(Excelente)          |

| TÓPICOS VISTORIADOS | NOTA | OBSERVAÇÕES DO VISTORIADOR |
|---------------------|------|----------------------------|
|---------------------|------|----------------------------|

|  |  |  |
|--|--|--|
| Os produtos químicos utilizados, defensivos e medicamentos, têm registro no Ministério da Agricultura para aquela atividade? |  |  |
|--|--|--|

|   |  |  |
|---|--|--|
| O produtor segue as instruções do rótulo dos produtos químicos, principalmente no que diz respeito ao rigoroso período de carência para consumo humano, período que vai desde a última aplicação até a colheita ou abate? |  |  |
|---|--|--|

|   |  |  |
|---|--|--|
| Estão sendo registradas pelo produtor as aplicações químicas, em planilha específica, contendo data, quadra, nome comercial, princípio ativo e período de carência? |  |  |
|---|--|--|

|  |  |  |
|--|--|--|
| As pessoas envolvidas com as aplicações químicas, recebem treinamentos específico? |  |  |
|--|--|--|

|   |  |  |
|---|--|--|
| As pessoas envolvidas com as aplicações químicas ou que participem de algum ambiente insalubre, recebem os EPI's necessários (bota, luva, máscara, óculos, macacão...)? |  |  |
|---|--|--|

|   |  |  |
|---|--|--|
| Os equipamentos de proteção individuais (EPI's) são guardados em local próprio. |  |  |
|---|--|--|

|  |  |  |
|--|--|--|
| Os equipamentos para as aplicações químicas apresentam-se em boas condições? |  |  |
|--|--|--|

|  |  |  |
|--|--|--|
| O local de armazenamento dos produtos químicos tem sinalização de perigo (placa: caverinha, defensivos, produtos químicos...) e tem acesso restrito? |  |  |
|--|--|--|

|   |  |  |
|---|--|--|
| Para socorrer um eventual acidente (contaminação química), existe algum procedimento, utensílio de emergência, lista de telefone de contato, para atender casos deste tipo, na propriedade. |  |  |
|---|--|--|

|  |  |  |
|--|--|--|
| O produtor cumpre com a Legislação no que diz respeito ao descarte das embalagens de agrotóxicos (devolução ao comerciante)? |  |  |
|--|--|--|

|   |  |  |
|---|--|--|
| O local de lavagem dos equipamentos e preparo das caldas para pulverização, oferece risco de contaminação ao meio ambiente? |  |  |
|---|--|--|

|   |  |  |
|---|--|--|
| Os efluentes, resíduos das Agroindústrias, estão sendo tratados conforme legislação local (Fepan...)? |  |  |
|---|--|--|

**RELATÓRIO VISTORIAS**  
**"CLUBE DOS PRODUTORES"**

"Check List"

**Nome do Produtor:**

**Local:**

**Data da Vistoria:**

| <b>Legenda Notas:</b>                 | <b>Nota 1</b><br>(Insatisfatório) | <b>Nota 2</b><br>(Necessita corrigir) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Nota 3</b><br>(Necessita melhorar) | <b>Nota 4</b><br>(Satisfatório)   | <b>Nota 5</b><br>(Excelente)          |

| <b>TÓPICOS VISTORIADOS</b>  | <b>NOTA</b> | <b>OBSERVAÇÕES DO VISTORIADOR</b> |
|---|-------------|-----------------------------------|
| O produtor faz uso de práticas que visem o controle da erosão do solo?  |             |                                   |
| O produtor faz rotação de culturas em sua propriedade?  |             |                                   |
| O produtor utiliza matéria orgânica, visando minimizar o uso de fertilizantes químicos?   |             |                                   |
| No preparo do solo, o produtor utiliza técnicas aprovadas que mantenham a sua estrutura e evitem a sua compactação?   |             |                                   |
| O produtor faz uso de práticas que visem a preservação de reservas florestais, bem como matas ciliares e mananciais de água?  |             |                                   |
| O produtor faz uso de práticas que visem a preservação de espécies animais?   |             |                                   |
| Além da remuneração normal, o produtor oferece alguma outra prática que vise o bem estar de quem participa do processo produtivo, tais como: moradia, água, luz, transporte...  |             |                                   |
| Há contratação de mão de obra infantil?   |             |                                   |
| Os filhos menores do produtor ou de seus funcionários estão na escola?  |             |                                   |
| O produtor participa de algum programa de "Responsabilidade Social" da região, como por exemplo: Doação financeira ou de algum tipo de material para alguma instituição ou ainda que tenha contratado algum funcionário deficiente? |             |                                   |

**Nota do produtor:**

**% de enquadramento:**

**Amostra para Laboratório:**

**Outros comentários:**