



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INDICADORES DE QUALIDADE DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)
PRODUZIDAS EM MUNICÍPIOS DO SERTÃO PARAIBANO: ASPECTOS
MICROBIOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS**

NEWCÉLIA PAIVA BARRETO

Patos – PB
Fevereiro, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INDICADORES DE QUALIDADE DE ALFACES (*Lactuca sativa* L.)
PRODUZIDAS EM MUNICÍPIOS DO SERTÃO PARAIBANO: ASPECTOS
MICROBIOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade
Federal de Campina Grande em
cumprimento às exigências
do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia para a
obtenção do título de Mestre.

Newcélia Paiva Barreto

ORIENTADOR: Prof. Dr. ONALDO GUEDES RODRIGUES
COORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. ROSÁLIA SEVERO MEDEIROS

Patos – PB
Fevereiro, 2018

B273i Barreto, Newcélia Paiva

Indicadores de qualidade de alfaces (*Lactuca sativa* L.) produzidas em municípios do sertão paraibano: aspectos microbiológicos e parasitológicos / Newcélia Paiva Barreto. – Patos, 2018.
57f.; il.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2018.

“Orientação: Prof. Dr. Onaldo Guedes Rodrigues”.

Referências.

1. Contaminação. 2. Higiene. 3. Microbiota. 4. Coliformes. 5. Sanitizantes. I.Título.

CDU 576.88



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Indicadores de qualidade de alfaces (*Lactuca sativa* L.), produzidas em municípios do sertão paraibano: aspectos microbiológicos e parasitológicos”

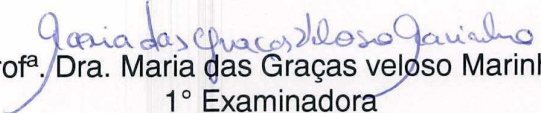
AUTORA: NEWCÉLIA PAIVA BARRETO

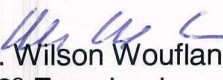
ORIENTADOR: Prof. Dr. ONALDO GUEDES RODRIGUES

JULGAMENTO


CONCEITO: APROVADO


Prof. Dr. Onaldo Guedes Rodrigues
Presidente


Prof.ª Dra. Maria das Graças veloso Marinho
1º Examinadora


Prof. Dr. Wilson Wouflan Silva
2º Examinador

Patos - PB, 27 de fevereiro de 2018


Prof. Dr. José Fábio Paulino de Moura
Coordenador PPGZ/CSTR/UFCEG
Prof. Dr. José Fábio Paulino de Moura
Coordenador

Dedicatória

Á Deus e a minha família!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me concedido a dádiva da vida, que tem sido o autor de todas as minhas conquistas, por abençoar o meu caminhar, me presenteando com as oportunidades, capacitando-me e fortalecendo nas minhas escolhas e decisões e por nunca ter me deixado desamparada ou sem forças para continuar. Posso dizer que senti a vossa presença em todos os momentos, fossem eles de ansiedade, de desânimo ou falta de coragem. O Senhor sempre me ajudava a ser mais forte e persistente, me mostrando, a cada dia, que eu estava mais próxima de um sonho que estava prestes a se concretizar.

A minha avó paterna Ana Minervina Barreto (in memoriam) pelos valores e ensinamentos, por estar presente nas minhas melhores recordações.

Aos meus pais, Newton Batista Barreto e Francisca Célia Paiva Barreto, pelos ensinamentos. A minha gratidão por anos de amor, dedicação, carinho e por não medir esforços para me proporcionar sempre o melhor.

Aos meus irmãos, Newcely, Newceya, Newcleya e Newton Filho, que apesar da estarem distantes, estavam torcendo pela minha conquista.

Ao meu filho, Ronaldo Nóbrega de Araújo Filho, por dá razão a minha vida e por me incentivar e apoiar todos os dias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Onaldo Guedes Rodrigues, que acreditou no meu trabalho desde o primeiro momento em que nos conhecemos. Serei eternamente grata por toda atenção a mim dispensada. Pelas suas sugestões, orientações e pelo grande aprendizado que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Wilson Wolflan Silva, pela confiança, palavras sábias e apoio nas análises parasitológicas.

A Prof. Dra. Rosália Severo Medeiros, pela paciência, sabedoria, amizade, conselhos e tempo dedicados desde os primeiros dias da fase experimental.

A Prof. Dra. Maria das Graças Veloso Marinho pelos ensinamentos, amizade e atenção.

A Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)- Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ) pela oportunidade de aprendizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em especial, ao Prof. Dr. José Morais Pereira Filho, Prof. Dr. Divan Soares, Prof. Dr. Clebert José Alves, Prof. Dr. Severino Silvano Higino, Prof. Dr. Marcilio Fontes Cezar, Prof. Dr. Olaff Bakker, Prof. Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde pela oportunidade que me deram na pesquisa, pelo apoio à docência,

ensinamentos, paciência, e principalmente, pelo vínculo de amizade e confiança.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Wilson Wolflan Silva, Prof. Dra. Maria das Graças Veloso Marinho, Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino, pelo aceite para a composição da banca.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Zootecnia –PPGZ -UFCG, Prof. Dr. José Fabio Paulino sempre atencioso.

Ao Sr. Arimateia Cruz Guedes, secretário do curso de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ)-UFCG pelo apoio, atenção e presteza.

A técnica de laboratório Sra. Aline de Farias Diniz pelo grande auxílio e atenção sempre tão pontuais.

Ao Sr. Eduardo Xavier de França pela colaboração.

Aos pós-graduandos do PPGZ, pelos anos de aprendizado, conhecimentos compartilhados, amizade e companheirismo. Muito obrigada!

Aos amigos (a) de pós-graduação, Suely de Lima Santos, Patrícia da Silva Costa, Rener Luciano Ferraz, Amanda Costa, Vitória Viviane Ferreira de Aquino e Ariádne Carvalho, antes desconhecidos, agora pessoas que jamais esquecerei, por todos os momentos de aprendizado e diversão.

Ao Sr. Carlos Brilhante técnico do Herbário Florestal da UFCG/CSTR, pela presteza com que atende a quem o procura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela

concessão da bolsa.

Aos produtores rurais que aceitaram participar desta pesquisa.

A todos vocês, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iii
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
CAPÍTULO I: Avaliação microbiológica e parasitológica de alfaces (<i>Lactuca Sativa</i> L.) produzidas em municípios do sertão paraibano.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II: Avaliação da eficácia de métodos de higienização de hortaliças produzidas em municípios do sertão paraibano.....	38
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
CONCLUSÃO GERAL.....	57
ANEXOS.....	58

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Capítulo I

Tabela 1.	Resultados para Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e <i>Salmonella spp.</i> pesquisados em Alfaces (<i>Lactuca sativa</i> L) no Território Rural Serra do Teixeira, PB, 2017	24
Tabela 2.	Resultados das análises dos microrganismos Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes, <i>Salmonella spp.</i> pesquisados em Alfaces (<i>Lactuca sativa</i> L) no município de Patos, PB, 2017.....	25
Quadro 1.	Valores de referência para coliformes termotolerantes e <i>salmonela sp</i> , conformes RDC nº 12 de Janeiro de 2001,da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária(ANVISA).....	26
Tabela 3.	Percentual de contaminação microbiológicas das amostras de alfaces (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	30

Capítulo II

Tabela 1.	Resultado das análises microbiológicas para determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes (NMP/g) na amostra de alface de cultivo tradicional e das etapas de higienização.....	47
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1. Mapas com localização geográfica da área de realização do estudo.....13
- Figura 2. Procedimento para prova presuntiva de coliformes termotolerantes e coliformes totais pelo método NMP/g.17
- Figura 3. Procedimento para prova confirmatória de coliformes termotolerantes pelo método NMP/g.....18
- Figura 4. Placa de Petri contendo meio EMB e Tubos de ensaio contendo meio PCA.....19

Capítulo II

- Figura 1. Métodos de higienização utilizados na amostra.....43
- Figura 2. Procedimento para prova presuntiva de coliformes pelo método do Número Mais Provável.....44
- Figura 3. Procedimento para prova confirmatória de coliformes termotolerantes pelo método NMP/g.....45
- Figura 4. Placa de Petri contendo meio EMB e Tubos de ensaio contendo meio PCA.....46

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo I

- Gráfico 1. Percentual de Parasitos encontrados nas amostras de alfaces (*Lactuca Sativa* L.) no Território Rural Serra do Teixeira,Pb.....20
- Gráfico 2. Percentual de Parasitos encontrados nas amostras de alfaces (*Lactuca Sativa* L.) no Território Rural Serra do Teixeira,Pb.....21
- Gráfico 3. Percentual de parasitos encontrados em amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.) no município de Patos, PB.....21
- Gráfico 4. Percentual de parasitos encontrados em amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.) no município de Patos, PB.....22
- Gráfico 5. Percentual de parasitos encontrados em amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.). Território Rural Serra de Teixeira,PB e município de Patos, PB.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA – American Public Health Association
CEC – Caldo Escherichia coli
CF – Coliformes Fecais
CLST- Caldo Lauril Sulfato Triptose
CSTR – Centro de Saúde e Tecnologia Rural
CT – Coliformes Totais
CVBLB – Caldo Verde Brihante Lactose Bile
DTA'S – Doenças Transmitidas por Alimentos
EMB- Ágar Eosina Azul de Metileno
FDA – Food and Drug Administration
IMVIC- Indol, vermelho de Metil, Voges-Proskauer e Citrato
NMP – Número Mais Provável
°C - Celsius
PCA – Ágar Padrão para Contagem
PVC- Policloreto de Polivinila
RDC Resolução da Diretoria Colegiada
UACB Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFCG- Universidade Federal de Campina Grande

INDICADORES DE QUALIDADE DE ALFACES (*Lactuca sativa* L.) PRODUZIDAS EM MUNICÍPIOS DO SERTÃO PARAIBANO: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS.

BARRETO, N.P.; RODRIGUES, O.G.; MEDEIROS, R.S.

RESUMO

Dentre as hortaliças mais consumidas, a alface (*Lactuca sativa* L.) é considerada a mais popular devido a vários fatores, destacando-se primeiramente seu sabor suave, segundo, sua produção fácil e adaptável a qualquer tipo de solo e, conseqüentemente, a sua disponibilidade no mercado e baixo custo. É a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil, e estas, consumidas cruas, necessitam ser puras e saudáveis. Nesse contexto, objetivou-se identificar agentes microbianos presentes em hortaliças cultivadas em diferentes cidades do sertão da Paraíba, por meio de análises microbiológicas e parasitológicas e em seguida avaliar o agente de sanitização mais eficaz no processo de higienização dessas hortaliças. Foram realizadas análises microbiológicas de acordo com o método padronizado pela American Public Health Association (APHA, 1995) e para análise parasitológica empregou o método baseado por Lutz, Hoffman e foram coletadas 15 amostras de alface (*Lactuca sativa* L.), de propriedades rurais do município de Teixeira-PB e 15 amostras de alfaces no município de Patos-PB. Desse total, constatou-se que 46,4% e 80% das alfaces analisadas, estavam contaminadas, nos municípios de Teixeira, PB e Patos, PB respectivamente. De acordo com a RDC nº12 de 02 Janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, as hortaliças cruas devem apresentar-se livres da presença de *Salmonella spp.* em 25g de produto, sendo tolerada a presença de até 10^2 NMP/g da amostra para coliformes termotolerantes. As amostras de ambos os municípios, apresentaram formas imaturas de nematódeos e protozoários, constatando-se contaminação por estruturas de parasitos de cães como o *Toxocara spp.* *Toxoplasma*, protozoários como *Giardia lamblia*, *Ancylostoma spp.* e *Ascaris*. A legislação estabelece como padrão a “ausência” de parasitas e larvas. Nessa perspectiva o processo de higienização das hortaliças cruas deve garantir a segurança do consumo das mesmas, contudo verificou-se a eficácia do ácido acético 6,6% (vinagre) e do hipoclorito de sódio 1% (água sanitária) na higienização da alface (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) *in natura*, proveniente de feira livre da cidade de Patos, PB. Constatou-se que o hipoclorito de sódio foi mais eficaz como método de sanitização das folhas da alface. O ácido acético (vinagre) muitas vezes utilizado para a higienização da alface, não se mostrou totalmente eficiente, já que foram enumeradas células de coliformes termotolerantes, nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Contaminação, Higiene, Microbiota, Coliformes, Sanitizantes.

QUALITY INDICATORS OF ALFACE (*Lactuca sativa* L.) PRODUCED IN MUNICIPALITIES OF SERTÃO PARAIBANO: MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL ASPECTS.

BARRETO, N.P.; RODRIGUES, O.G. ; MEDEIROS, R.S.

ABSTRACT

Among the most consumed vegetables, lettuce (*Lactuca sativa* L.) is considered the most popular due to several factors, especially its mild flavor, second, its easy production and adaptable to any type of soil and, consequently, its availability in the market and low cost. It is the most traded leafy vegetable in Brazil, and these, eaten raw, need to be pure and healthy. In this context, the objective was to identify microbial agents present in vegetables grown in different cities of the interior of Paraíba, by means of microbiological and parasitological analyzes and then to evaluate the most effective sanitizing agent in the hygiene process of these vegetables. Microbiological analyzes were performed according to the standardized method by the American Public Health Association (APHA, 1995) and for parasitological analysis the Lutz-based method (NEVES, 2005) was used. Fifteen samples of lettuce (*Lactuca sativa* L.) were collected from rural properties of the municipality of Teixeira-PB and 15 samples of lettuce in the municipality of Patos-PB. From this total, 46.6% and 80% of the lettuces analyzed were contaminated in the municipalities of Teixeira, PB and Patos, PB, respectively. According to DRC No. 12 of 02 January 2001 of the National Agency for Sanitary Surveillance - ANVISA, raw vegetables should be free of the presence of *Salmonella* spp. in 25g of product, the presence of up to 10² NMP / g of the sample for thermotolerant coliforms being tolerated. Samples from both municipalities showed immature forms of nematodes and protozoa, showing contamination by structures of parasites of dogs such as *Toxocara* spp. *Toxoplasma*, protozoa such as *Giardia lamblia*, *Ancylostoma* spp. and *Ascaris*. The legislation establishes as the default the "absence" of parasites and larvae. In this perspective, the hygienic process of the raw vegetables should guarantee the safety of their consumption. However, the effectiveness of acetic acid (vinegar) and sodium hypochlorite 1% (sanitary water) in the hygiene of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Crispa*) in natura, from the free fair of the city of Patos, PB. It was found that sodium hypochlorite was more effective as a method of sanitizing lettuce leaves. Acetic acid (vinegar), often used for the cleaning of lettuce, was not fully efficient, since thermotolerant coliform cells were enumerated in the analyzed samples.

Keywords: Contamination, Hygiene, Microbiota, Coliforms, Sanitizers.

INTRODUÇÃO GERAL

O consumo de vegetais in natura, independentemente do sistema de cultivo, constitui um importante meio transmissor de inúmeras doenças de origem alimentar (SILVA et al.,2010).A preocupação do homem com a qualidade e a segurança dos alimentos cresce consideravelmente a cada ano. É por isso que na escolha dos alimentos os consumidores cada vez mais levam em consideração os riscos alimentares que os produtos podem oferecer (CHINNICI, D'AMICO, PECORINO, 2002).

O controle higiênico-sanitário tanto do alimento como dos manipuladores, é preponderante para prevenção das doenças de origem alimentar (KUHN et al., 2012) e caso não haja uma higienização adequada das mãos a todo o momento em que a pessoa for ingerir algum tipo de alimento, pode ocorrer contaminação, carreando possíveis patologias. Contudo, a contaminação microbiológica e parasitológica dependerá principalmente das práticas de produção adotadas na propriedade e das condições ambientais, assim sendo, tanto os alimentos orgânicos ou hidropônicos, como os convencionais estariam sujeitos aos diferentes níveis de contaminação (SMITH, 1993).

As hortaliças, sobretudo as consumidas cruas, representam um importante meio de transmissão de doenças infecciosas, como as intestinais, uma vez que helmintos, protozoários e outros patógenos podem estar presentes nas mesmas (TAKAYANAGUI et al., 2006).Os vegetais folhosos se destacam como um dos veículos de contaminação mais significativos, pois oferecem maiores condições para retenção e sobrevivência dos organismos neles depositados. No Brasil e no mundo relata-se a importância da alface como

veículo de transmissão de formas infectantes de parasitos e outros agentes microbianos. Estudos demonstram variação na frequência de contaminação em amostras de alface, devido a diferentes localidades de coleta, técnicas utilizadas no diagnóstico, tipos de hortaliças estudadas e formas de cultivo (CANTOS et al.,2004).

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

É a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil, sendo a sexta em importância econômica e a oitava em termos de volume produzido, além de ser muito utilizada na composição de diversas preparações. Peculiar de países que apresentam temperaturas amenas e devido ao melhoramento genético e cultivo em ambiente protegido seu cultivo se dá em todas as épocas do ano (ALMEIDA, 2006). Possui baixo valor calórico, o que favorece grandemente o seu consumo in natura (SANTANA et al., 2006), constituindo-se um componente imprescindível das saladas dos brasileiros.

Considerada entre os alimentos mais implicados em surtos de doenças de origem alimentar no Brasil e em diversos países, envolvendo principalmente, a bactéria *Escherichia coli* e seus diferentes sorogrupos. A identificação de *E. coli* é relevante, pois além de indicar contaminação fecal recente, alguns sorogrupos causam enfermidades importantes no trato

gastrointestinal, como a *E. coli* O157: H7, presente em adubos e/ou água, a qual pode ser introduzida na alface através da raiz e migrar para a porção comestível do vegetal (FELTRIM et al., 2005).

Outros microrganismos patogênicos que podem utilizar a alface como veículo são: *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Clostridium spp* e *Yersinia enterolítica*. Deve-se ainda citar os enteroparasitas, que podem ser encontrados em alimentos: cistos de *Entamoeba coli*, ovos de *Taenia sp*, *Ascaris sp*, ovos e cercárias de *Schistosoma mansoni*, além de larvas de nematódeos de vida livre (LONCAREVIC., 2005). A capacidade desses microrganismos em causar doenças de origem alimentar, caracterizadas em geral por vômito e diarreia, está relacionada à sua virulência, carga parasitária ingerida, inalada ou absorvida e fatores associados como idade, estado nutricional, imunossupressão e outras patologias que podem favorecer o aparecimento de quadros patogênicos letais (DARYANI., 2008).

No Brasil, não obstante a relevância e atualidade do problema, são poucos os trabalhos que avaliam a qualidade das hortaliças consumidas pela população. Apesar da importância deste problema para a saúde pública, a escassez de trabalhos desenvolvidos no Brasil e na Região Nordeste que assegure a qualidade das hortaliças in natura consumidas pela população é preocupante (SANTANA et al., 2006). A maioria dos trabalhos é oriunda das Regiões Sul e Sudeste, provavelmente porque aí, se concentra o maior número de consumidores com hábitos de ingestão de alfaces cruas em saladas e sanduíches. Assim, o diagnóstico laboratorial de protozoários e helmintos parasitas de humanos e animais e demais patógenos, como inúmeros tipos de

bactérias em hortaliças, é de extrema magnitude para a saúde pública, uma vez que fornecem subsídios acerca das condições higiênico-sanitárias envolvidas na produção, armazenamento, transporte e manuseio desses alimentos, permitindo com isso o controle retrospectivo das condições em que foram cultivadas (SANTANA et al., 2006).

A qualidade e segurança de hortaliças frescas dependem de sua microbiota, cada etapa percorrida entre o produtor e o consumo final influenciará nos aspectos higiênico-sanitários do produto. Manejo, armazenamento, transporte e comercialização incorretos, podem comprometer a qualidade e segurança do alimento através do aumento da população de microrganismos, no entanto a adoção de práticas de produção e higiene adequadas contribuem para redução dos riscos sanitários desses alimentos (MAISTRO, 2006).

Nesse contexto, objetivou-se identificar os agentes microbianos e parasitários presentes em hortaliças cultivadas em diferentes cidades do sertão da Paraíba, por meio de análises microbiológicas e parasitológicas e em seguida avaliar qual agente sanitizante é mais eficaz no processo de higienização dessas hortaliças.

A presente dissertação é composta por dois capítulos. O primeiro capítulo objetiva avaliar a qualidade higiênico-sanitária de alfaces (*Lactuca sativa* L.) produzidas do Território Rural Serra de Teixeira e município de Patos, sertão Paraibano, que foi submetido à revista Acta Brasiliensis.

O segundo capítulo tem como objetivo avaliar qual agente sanitizante é mais eficaz no combate aos microrganismos encontrados nas amostras de

alfaces (*Lactuca sativa* L.) provenientes de produtores da agricultura familiar, do sertão Paraibano, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. T. T. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes self-service no município de Limeira-SP. **Dissertação**. Piracicab.Atheneu, 2005.

CANTOS, G. A. SOARES, B. MALISKA, C. Gick, D. GUIMARÃES, A.M. ALVES, E.G.L. FIGUEIREDO, H.C.P. COSTA, G. M. Estruturas parasitárias encontradas em hortaliças comercializadas em Florianópolis, Santa Catarina. **News Lab**.2004; 66:154-63.

CHARLES NKUFI TANGO, NA-JUNG CHOI, MYUNG-SUB CHUNG, and DEOG HWAN OH Bacteriological Quality of Vegetables from Organic and Conventional Production in Different Areas of Korea. *Journal of Food Protection*: August 2014, Vol. 77, No. 8, pp. 1411-1417,2014

CHINNICI, G.; D'AMICO, M.; PECORINO, B. A multivariate statistical analysis on the consumers of organic products. **British Food Journal**, Catania, v. 104, Iss. 3/4/5, p. 187-199, 2002.

DARYANI, A.; et al. Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. **Food Control**,v.19, n.8, p. 790-794, 2008.

FELTRIM, A. L. Et al. Produção de alface americana em solo e em hidroponia, no inverno e verão, em Jaboticabal - SP. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, n.4, p.505-509, 2005.

Food Science and Technology Print version ISSN 0101-2061 On-line version ISSN 1678-457X **Ciência Tecnologia de Alimentos**, vol.26 no.2 Campinas April/June 2006 <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000200006>

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo:

KUHN, C.R; GANDRA, E.A.; FERREIRA, L.R.; BARTZ, J.; GONZÁLES, A.P.; GAYER, C.F. Qualidade microbiológica de lanches comercializados na cidade de Pelotas – RS. **Global Science and Technology**, v.5, n.3, p.01-10, 2012

MAISTRO, L. C. Avaliação Microbiológica Visando a Utilização e Comparação de Métodos Rápidos e Convencionais em Vegetais Folhosos Minimamente Processados. 2006. 270f. **Tese** (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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

SANTANA, L.R.R.; CARVALHO,R.D.S.; LEITE, C.C. ; ALCÂNTARA, L.M.; OLIVEIRA, W.S.; RODRIGUES,B.M. Qualidade Física, Microbiológica e Parasitológica de Alfaces (*Lactuca sativa*) em Diferentes Sistemas de Cultivo. **Revista Tecnologia Alimentos**, v. 26,p. 264-269, 2006.

SILVA,P.I.A.P.;CARVALHO,J.S.;COSTA,L.F.M.;DOMINGUEZ,G.F.;CARVALHO,M.R.B.;ORGE,M.D.;VALE,V.L.C. Condições sanitárias e ambientais das águas de irrigação de hortas e de *Lactuca sativa* (alface) nas cidades de Catu e Alagoinhas–BH, Brasil. **Revista de Ciências Médica e Biológicas**. 9(3) p.194-199.2010.

SMITH, B. L. Organic foods vs. supermarket foods: element levels. **Journal of Applied Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 35-39, 1993.

TAKAYANAGUI, O. M. et al. Análise da cadeia de produção de verduras em Ribeirão Preto, SP. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.2, p.224-226, 2006.

CAPITULO I

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DE ALFACES (*Lactuca sativa* L.) PRODUZIDAS EM MUNICÍPIOS DO SERTÃO PARAIBANO

**MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL EVALUATION OF
ALFACES (*Lactuca sativa* L.) PRODUCED IN MUNICIPALITIES OF
SERTÃO PARAIBANO**

(Artigo científico submetido ao periódico Revista de Saúde Pública)

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DE ALFACES

(*Lactuca sativa* L.) PRODUZIDAS EM MUNICÍPIOS DO SERTÃO

PARAIBANO.

BARRETO, N. P.; RODRIGUES, O. G.; MEDEIROS, R. S. BARNABÉ, N. N. C.

RESUMO

Em decorrência das mudanças no hábito alimentar da população, essencialmente no que se refere à tendência de consumo de hortaliças, objetivou-se avaliar os índices microbiológicos e parasitológicos de alfaces (*Lactuca sativa* L.), oriundas de produtores rurais de localidades do Território Rural Serra do Teixeira, PB e município de Patos, PB. Coletou-se 30 amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.), 15 de cada localidade. As amostras foram processadas para realização das análises microbiológicas de acordo com o método padronizado pela American Public Health Association (APHA, 1995), utilizando-se a Técnica do Número Mais Provável (NMP) e para análise parasitológica empregou-se a técnica de sedimentação espontânea, com modificação (LUTZ, 1919; HOFFMANN, PONS e JANER, 1934). Ficou evidenciada a contaminação de 46,4 e 80% das 30 amostras analisadas no Território Rural Serra do Teixeira, PB e município de Patos, PB, respectivamente. Apresentando-se impróprias para o consumo de acordo com legislação vigente, a RDC nº 12 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Palavras-chave: Hortaliças, Análises, Contaminação, Consumo.

MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL EVALUATION OF ALFACES (*Lactuca sativa* L.) PRODUCED IN MUNICIPALITIES OF SERTÃO PARAIBANO.

BARRETO,N.P.;RODRIGUES,O.G.;MEDEIROS,R.S. BARNABÉ, N. N. C.

ABSTRACT

As a result of the changes in the food habits of the population, mainly in relation to the tendency of vegetable consumption, the objective was to evaluate the microbiological and parasitological indices of lettuce (*Lactuca sativa* L.), originating from rural producers in localities of the Território Rural Serra do Teixeira, PB and municipality of Patos, PB. 30 samples of lettuces (*Lactuca sativa* L.), 15 from each locality, were collected. The samples were processed for the microbiological analysis according to the method standardized by the American Public Health Association (APHA, 1995), using the Most Likely Number Technique (NMP) and for parasitological analysis the technique of spontaneous sedimentation , with modification (LUTZ, 1919; HOFFMANN, PONS and JANER, 1934). It was evidenced the contamination of 46.4 and 80% of the 30 samples analyzed in the Serra do Teixeira Rural Territory, PB and the municipality of Patos, PB, respectively. Unfit for consumption in accordance with current legislation, DRC No. 12 of January 2001, of the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA).

Keywords: Vegetables, Analysis, Contamination, Consumption.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, percebe-se que em nível mundial, está ocorrendo grandes modificações no hábito alimentar da população, essencialmente no que se refere a uma tendência do consumo de hortaliças preferencialmente in natura. Tal fato é consequência, sobretudo, da busca de uma alimentação mais saudável e devido a estas possuírem sabor agradável e serem de boa aceitação. As hortaliças de uma maneira geral são de grande importância na dieta alimentar uma vez que fornecem uma considerável quantidade de nutrientes para o desenvolvimento e regulação orgânica do corpo humano. Sendo fontes de vitaminas A, B3, C, minerais (cálcio e fósforo) e fibras (ABOUGRAIN, 2010).

Os vegetais como bem diz sua definição, são seres carentes da capacidade de transladar-se de um lugar a outro; em que os órgãos de nutrição, respiração etc., estão na parte externa do corpo; nos quais predominam, em sua composição, substâncias glicídicas que, para sua alimentação, utilizam matérias orgânicas do solo e da atmosfera (EVANGELISTA, 2001).

As hortaliças folhosas são recomendadas na dieta alimentar de pessoas em tratamento da obesidade e doenças crônico-degenerativas (doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e câncer) por apresentarem baixo valor calórico, ampliando com isso, seu mercado. A importância da alface na alimentação e saúde humana se destaca por ser fonte de vitaminas e sais minerais, constituindo-se na mais popular dentre aquelas em que as folhas são

consumidas. Seu consumo é feito na forma in natura, e nessas condições apresenta a seguinte composição média, por 100 g: água: 94%; valor calórico: 18 Kcal; proteína: 1,3 g extrato etéreo: 0,3 g; carboidratos totais: 3,5 g; fibra: 0,7 g; cálcio: 68 mg; fósforo: 27 mg; ferro: 1,4 mg; potássio: 264 mg; tiamina: 0,05 mg; riboflavina: 0,08 mg; niacina: 0,4 mg; vitamina C: 18,0 mg, segundo (SGARBIERI 1987), para alface produzida no solo (OHSE; NETO e MARFROM, 2001).

A flora microbiana de vegetais retirados da terra deve ser a mesma do solo onde esses vegetais cresceram, embora ocorram exceções. Os actinomicetos (uma divisão das bactérias Gram positivas) são as bactérias mais abundantes em solos estáveis, embora raramente sejam encontrados em produtos vegetais. Por outro lado, as bactérias ácido lácticas não são facilmente encontradas no solo, mas são uma parcela significativa da biota bacteriana de plantas e seus produtos. A grande exposição desses produtos ao ambiente proporciona uma contaminação por microrganismos. A camada protetora de muitas frutas e vegetais e o pH que alguns possuem, com valores abaixo do pH de crescimento de muitos microrganismos, são fatores importantes na microbiologia desses produtos (JAY, 2005).

Visando proteção à saúde da população, a Resolução – RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA¹², estabelece padrões microbiológicos quanto à presença de *Salmonella spp* e coliformes termotolerantes. Segundo tais padrões, hortaliças cruas devem apresentar-se livres da presença de *Salmonella spp*. em 25g de produto, sendo tolerada a presença de até 10^{-2} NMP/g da amostra para

coliformes termotolerantes. Em relação aos enteroparasitas, a referida Legislação estabelece como padrão a “ausência” de parasitas e larvas.

Nessa perspectiva objetivou-se avaliar os índices microbiológicos e parasitológicos de alfaces (*Lactuca sativa* L.), oriundos de produtores rurais de localidades do Território Rural Serra do Teixeira, PB e município de Patos, sertão da Paraíba.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de Realização do Experimento

A pesquisa foi realizada em propriedades rurais produtoras de hortaliças selecionadas no território Rural Serra do Teixeira, PB localizado a 7° 15' 10" S e 37° 23' 3" O, e município de Patos, PB localizado a 07° 01' 28" S e 37° 16' 48" O.



Fonte: Google



2.2 Coleta e identificação das espécies

As coletas das espécies foram realizadas em duas áreas, A1-Território Rural Serra do Teixeira, PB, e A2- Município de Patos, PB margens do Açude do Jatobá. Um exemplar de cada amostra coletada foi prensada e posta para secagem em estufa a 60 °C para confecção das exsiccatas, seguindo-se as

técnicas usuais para herborização recomendadas por Forman e Bridson (1989), e registradas no Programa Brahm's. O material coletado foi depositado no Herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Patos-PB.

Análises morfológicas para as identificações, descrições das espécies foram realizadas com auxílio de chaves analíticas, diagnoses encontradas na bibliografia e comparação com as exsicatas do herbário do CSTR. A grafia dos táxons foi verificada na base de dados do MOBOT (2012).

2.3 Obtenção e Processamento das Amostras

As amostras foram coletadas nas primeiras horas da manhã, entre os meses de setembro e dezembro de 2016. Foram coletadas cinco amostras de cada produtor, em três propriedades rurais localizadas no Território Rural Serra de Teixeira-PB perfazendo um total de quinze amostras. No município de Patos, PB, procedeu-se da mesma maneira, totalizando cinco amostras por produtor, resultando em quinze amostras por localidade/propriedade, totalizando 30 amostras ao todo. Foram colhidos aleatoriamente, cerca de 250 g de alface (*Lactuca sativa* L.) nas variedades crespa e lisa, e estabeleceu-se como amostra o pé de alface ou touceira.

No procedimento de coleta das hortaliças, utilizou-se sacos plásticos de primeiro uso contendo as informações do local de coleta, horário, data, espécie/variedade, nome do produtor rural e respectiva propriedade. O transporte ocorreu em caixa térmica evitando o atrito e possíveis danos, sob processo de refrigeração (gelo reciclável) não deixando que ultrapassasse os 8

°C. Da chegada ao local de coleta ao início das análises durou em média duas horas. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao laboratório de microbiologia e parasitologia da UACB, UFCG campus de Patos, PB.

3. ANÁLISES PARASITOLÓGICAS

Para análise parasitológica empregou-se a técnica de sedimentação espontânea, com modificação (LUTZ, 1919; HOFFMANN, PONS e JANER, 1934). Foi pesado 100 gramas de hortaliça, adicionado 500 ml de água destilada, e em saco plástico de primeiro uso, efetuamos esfregaços, em seguida, com o auxílio de gaze hidrófila realizou-se a filtragem do líquido em cálices de sedimentação (de cada amostra foram preparados dois cálices), sendo estes cobertos com filme de PVC para evitar possíveis contaminações. Após 24 horas de repouso, seguindo o método de sedimentação espontânea, eliminou-se todo o sobrenadante. Com o auxílio de pipetas graduadas de vidro (5 ml) coletou-se uma alíquota do sedimento de aproximadamente 0,05 ml e colocou-se em lâmina de microscopia, foram feitas em triplicatas (três lâminas de cada cálice). Em seguida, cobriu-se com lamínula e observou-se com a utilização de microscópio óptico, com objetiva de 10X, sendo a leitura realizada por varredura para a identificação de parasitos ou larvas de vida livre e a confirmação das estruturas parasitárias foi realizada com a utilização da objetiva de 40X percorrido em todos os campos da lâmina.

4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram fundamentadas na determinação do número mais provável, pela técnica de fermentação em tubos múltiplos de

acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1991) e American Public Health Association (APHA,1995). Foram realizadas as análises exigidas pela RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, ou seja, contagem de coliformes termotolerantes a 45°C (coliformes fecais) e *Salmonella* spp (ANVISA,2001). A pesquisa de *Salmonella* spp foi executada segundo metodologia preconizada pela American Public Health Association (APHA, 1992).

4.1 Preparo das Amostras para Análises Microbiológicas

Cerca de 115g da amostra coletada foi assepticamente pesada, excluindo partes deterioradas e talos, transferiu-se 25 g para um erlenmayer contendo 225 ml de solução salina peptonada a 0,1% estéril e incubou-se em estufa bacteriológica a 35° C durante 48 horas para análise de Salmonela. Para as análises de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, transferiu-se 10g da amostra para um erlenmayer contendo 90 ml de água peptonada à 0,1%, obtendo-se a diluição 10⁻¹, sendo realizadas diluições subsequentes (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵). Foi transferido 1mL das diluições para os tubos de ensaio com tubos de Duhan invertidos e caldo lactosado esteril, em serie de três tubos para proceder a determinação de coliformes totais e fecais, seguindo de incubação em estufa bacteriológica durante à 37 °C por 24 - 48 horas.

4.2 Técnica do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes Coliformes Totais

Essa técnica consta de duas fases distintas: o teste presuntivo, onde se busca detectar a presença de microrganismos fermentadores de lactose e onde

é possível recuperar células injuriadas; e o teste confirmativo, onde se determina a população real de coliformes termotolerantes a 45°C (CTT) e coliformes totais (CT) (APHA, 1995).

Para a prova presuntiva foram utilizados as diluições de 10^{-1} à 10^{-5} , sendo semeadas alíquotas de 1 ml em uma série de 3 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (CLST). Incubou-se os tubos a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h e verificou-se o crescimento dos microrganismos através da produção de gás nos tubos de Duhan e/ou turvação do meio. Figura 2.

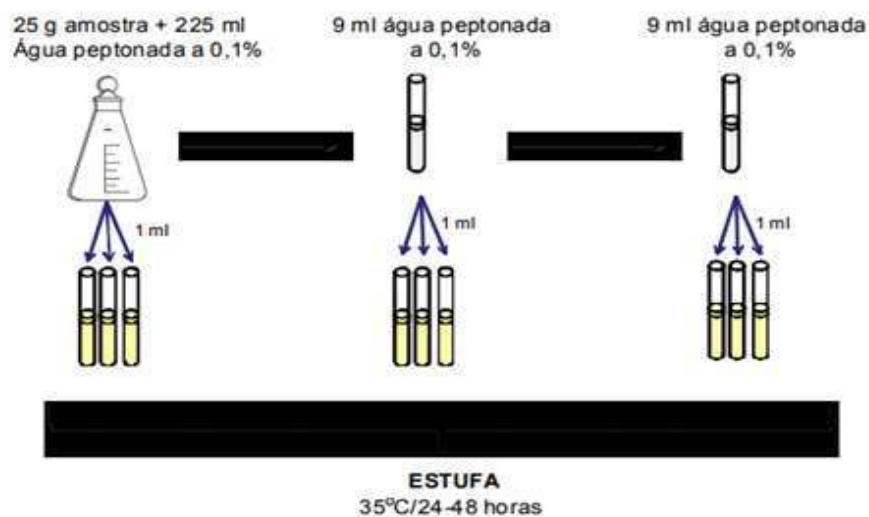


Figura 2. Procedimento para prova presuntiva de coliformes pelo método do Número Mais Provável.

Dos tubos positivos, foi realizado o teste para a confirmação de CT. Para tanto, os tubos positivos do caldo LST foram repicados para série de três tubos contendo caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% (CVBLB), os quais foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Para a prova confirmatória de CF, foram repicados os tubos positivos do caldo LST para tubos contendo caldo *E. coli* (EC) incubando-se por $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 48 h, em banho-maria com agitação.

A presença de gás indicou a positividade do tubo para a presença de CF conforme demonstra figura 3 (ABNT, 1991).

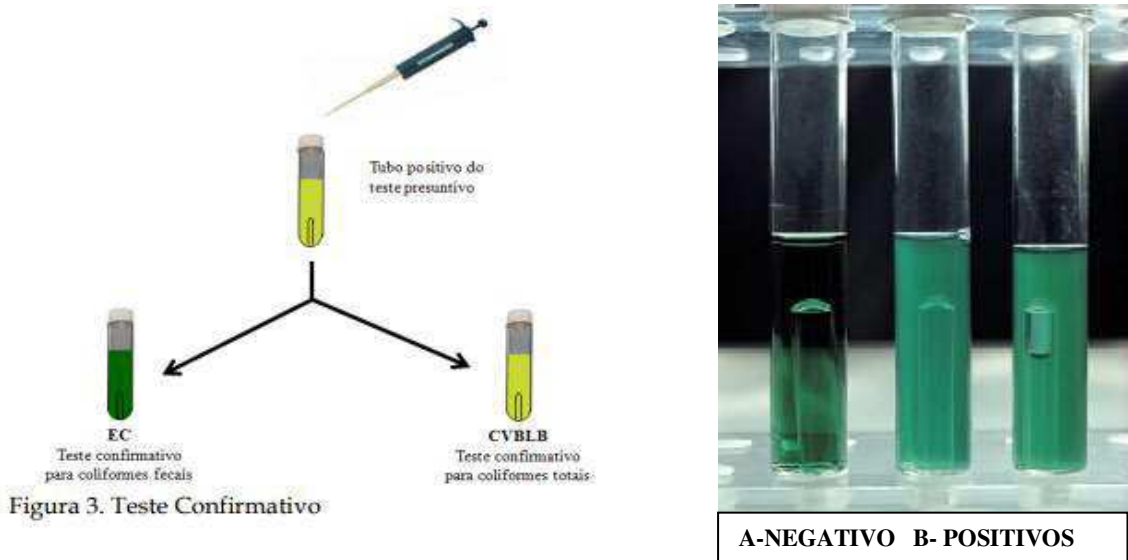


Figura 3 – Procedimento para prova confirmatória de coliformes pelo método do Número Mais Provável.

OBS: A- Tubo com resultado negativo para coliformes fecais. B- Tubo com resultado positivo para coliformes fecais, evidenciado pela turvação do meio de cultura e formação de gás no interior do tubo de Duhan.

O cálculo do NMP/g foi determinado com auxílio da tabela de NMP- séries de três tubos.

Também foram realizados testes bioquímicos para isolamento de *Escherichia coli* e outras enterobactérias. A partir dos tubos positivos do Caldo EC estriou-se, com alça de platina, em placas de Petri contendo meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e em seguida incubadas a 35 °C/24 h. Após o crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) características,

nucleadas com centro negro e brilho verde metálico, estas foram transferidas (três a cinco UFC de cada placa de Petri), com auxílio de alça bacteriológica, para tubos inclinados contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) que foram incubados a 35 °C/18-20 h.

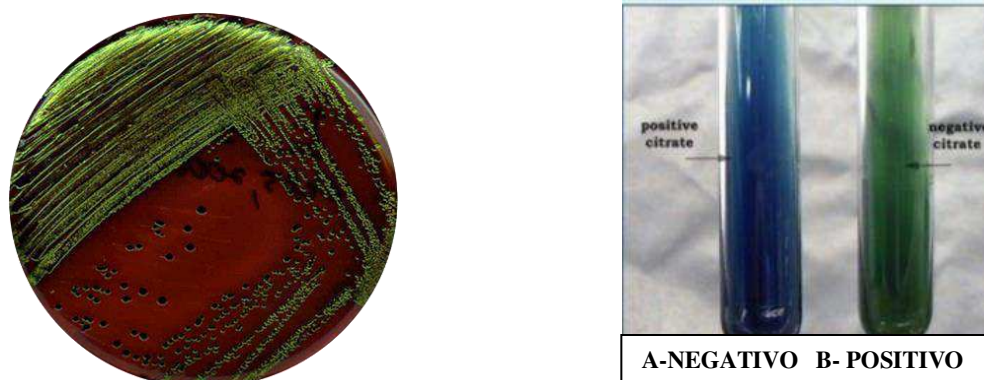


Figura 4. Placa de Petri, contendo meio EMB, após crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) características, nucleadas com centro negro e brilho verde metálico e tubos de ensaio contendo PCA e seus respectivos resultados positivo e negativo.

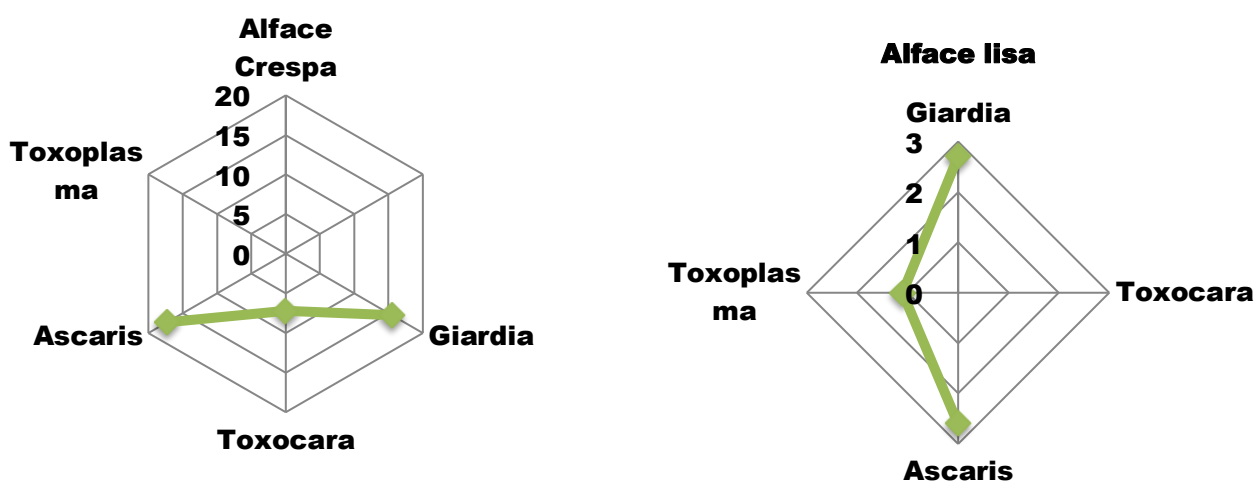
Depois de incubados transferiram-se alíquotas da cultura do PCA, por meio de alça bacteriológica para meios de cultura adequados para realização de provas bioquímicas para a identificação de *E. coli*. Os testes realizados foram: teste do Indol; teste de Voges-Proskauer; teste do Vermelho de Metila e teste do Citrato (IMViC).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas descrições morfológicas através de chaves de identificação botânica das espécies em estudo, permitindo assim avaliar o grau de contaminação microbiológica e parasitária das amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.) variedades crespa e lisa produzidas no território Rural Serra do Teixeira e município de Patos, sertão da Paraíba.

As alfaces do tipo crespa e lisa apresentaram contaminação em ambos os municípios, sendo o nível de contaminação maior identificada no município de Patos, PB, apresentando um percentual de contaminação de 80% das amostras analisadas (12/15), com relação as amostras de alface do Território Rural Serra do Teixeira, PB o nível de contaminação foi de 46,4% das amostras analisadas (7/15).Gráfico 1.

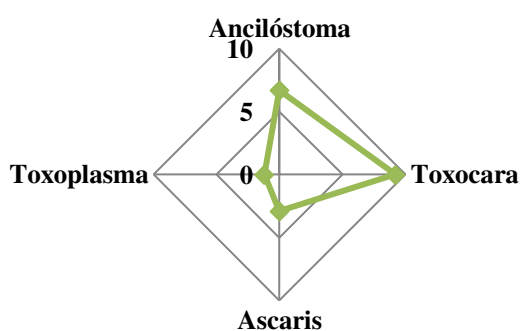
Gráfico 1. Percentual de estruturas parasitárias encontrados nas amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.) no Território Rural Serra do Teixeira, PB.



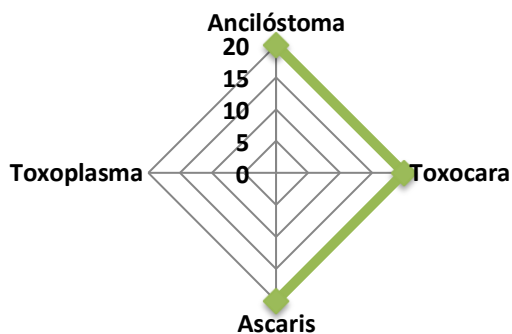
No Território Rural Serra do Teixeira 46,4% das amostras de alface analisadas estavam contaminadas e impróprias para o consumo de acordo com a legislação vigente. Gráfico 1

Gráfico 2. Percentual de estruturas parasitárias encontrados em amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.) no município de Patos, PB.

Alface crespa



Alface lisa



No município de Patos, 80% das amostras de alfaces em estudo, apresentaram contaminação e impróprias para o consumo. Dentre as formas parasitárias encontradas destacamos as seguintes estruturas: cistos de *Giardia lamblia*, ovos e oocistos de *Áscaris lumbricoides*, *Toxocara*, *Toxoplasma*.

Percentuais de contaminação parasitária mais elevada foram observados por Santos et al. (2009) e por Quadros et al. (2008), os quais verificaram uma frequência de contaminação nas amostras de alface crespa in natura analisadas de 90,0% e de 88,5%, nos estados da Bahia e de Santa Catarina, respectivamente.

Segundo Gelli et al. (1979), a estrutura do vegetal interfere com o grau de contaminação que possa apresentar. Assim, hortaliças com folhas múltiplas, com grande área de contato, permitem maior fixação de formas parasitárias. Além da estrutura vegetal, alface, repolho e outras folhosas têm maiores contaminações por estarem por um tempo maior em contato com o solo e, dessa forma, continuamente exposta à contaminação (ERDOGRUL e SENER, 2005).

A contaminação de hortaliças por agentes patogênicos verifica-se, principalmente, por meio de água contendo material fecal de origem humana ou animal, utilizada na irrigação de hortas ou ainda contaminação do solo por uso de adubo orgânico com dejetos fecais. Em um estudo realizado por Arbos et al. (2010) identificaram a presença de estruturas parasitárias em todas as amostras de alface de cultivo orgânico de diferentes produtores.

Um estudo avaliando a ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na Região Metropolitana de São Paulo revelou que todas as variedades de hortaliças analisadas apresentaram elevado percentual de contaminação por helmintos. Segundo os autores, os valores encontrados refletem as condições e práticas de cultivo inadequadas do ponto de vista

higiênico-sanitário (OLIVEIRA e GERMANO,1992). No Paraná, (Garcia et al., 2004) avaliaram amostras de hortaliças de Umuarama-PR e observaram *Ascaris sp.*, *Ancilostomatídeos*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides sp*, *Entamoeba sp* e *Giardia sp* em amostras de alface crespa, alface lisa e chicória.

Os trabalhos citados inferem que a contaminação parasitária em hortaliças ocorre por vários fatores que permeiam desde o cultivo até a pós-colheita, sendo assim, é de grande importância observar os processos de cultivo, adubação, transporte, estocagem e manipulação em geral.

Nos resultados das análises microbiológicas pode-se observar uma carga microbiana elevada nas amostras analisadas, conduzindo em perigo à população consumidora, uma vez que, muitas das amostras foram classificadas como impróprias para consumo, segundo a RDC Nº 12/2001.

Os resultados das análises para coliformes termotolerantes, coliformes totais e *Salmonella spp*, das amostras analisadas por município encontram-se nas tabelas de 1 e 2.

Tabela 1. Resultados das análises dos microrganismos Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Salmonella spp.* pesquisados em Alfaces (*Lactuca sativa* L.) no Território Rural Serra do Teixeira, PB.

AMOSTRAS	Coliformes Totais NMP/g	Coliformes Termotolerantes	Salmonella	RDC 12/2001 (ANVISA)
Produtor 1				
1	11,0	> 24	Ausência em 25g	Impróprio p/consumo
2	2,0	2,0	Ausência em 25g	Impróprio p/consumo
3	24,0	9,3	Ausência em 25g	Impróprio p/consumo
4	0,93	0,93	Ausência em 25g	Impróprio p/consumo
5	4,6	0,43	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
Produtor 2				
1	>240	> 240	Ausência em 25g	Impróprio p/consumo
2	2,4	2,4	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
3	0,04	0,23	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
4	2,4	0,03	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
5	>24	2,4	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
Produtor 3				
1	24	< 0,3	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
2	>24	0,12	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
3	11,0	< 0,03	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
4	11,0	< 0,03	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
5	0,28	< 0,03	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo

Fonte: A autor

Tabela 2. Resultados das análises dos microrganismos Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes, *Salmonella spp.* pesquisados em Alfaces (*Lactuca sativa* L.) no município de Patos, PB.

Amostras	Coliformes Totais NMP/g	Coliformes Termotolerantes	Salmonella	RDC12/2001 (ANVISA)
Produtor 1				
1	0,93	0,93	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
2	24	< 0,3	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
3	2,4	0,09	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
4	0,04	< 0,03	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
5	110	2,8	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
Produtor 2				
1	46	9,3	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
2	110	0,9	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
3	> 24	0,12	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
4	> 240	> 240	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
5	0,03	< 0,03	Ausência em 25g	Próprio p/ consumo
Produtor 3				
1	28	3	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
2	110	0,9	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
3	24,0	9,3	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
4	2,0	2,0	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo
5	11,0	< 24	Ausência em 25g	Impróprio p/ consumo

Fonte : A autora

Os resultados das amostras analisadas foram classificados em próprio e impróprio para consumo de acordo os padrões da legislação vigente, RDC nº 12 de Janeiro de 2001 (ANVISA), onde estabelece como limite de tolerância de contaminação das amostras a diluição 10^{-2} . Quadro 1.

Segundo as tabelas 1 e 2, foram encontrados 46,6% e 80% de positividade na detecção de coliformes termotolerantes e coliformes totais nas amostras analisadas do Território Rural Serra do Teixeira, PB e município de Patos, PB respectivamente. Embora não existam padrões para contagem de coliformes totais para hortaliças *in natura*, segundo RDC 12/2001(ANVISA), os resultados evidenciam a higiene precária e insatisfatória no processo de produção e distribuição das hortaliças, representando um grande risco biológico ao consumidor.

Pacheco et al.(2002), quando estudaram diversos vegetais comercializados na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP, de Sorocaba-SP, encontraram 87,5% das amostras de alface contaminadas por coliformes termotolerantes.

Em outra pesquisa realizada na cidade de São Paulo, 42% de 133 amostras de hortaliças prontas para o consumo, continham população de *Enterobacteriaceae* entre 5 e 6 log UFC.g-1 e 73% e apresentaram contagens de coliformes termotolerantes maiores do que 2 log UFC.g-1. Além disso, o autor também encontrou *Salmonella* em 4 amostras de alface, agrião, escarola e salada mista composta por beterraba, cenoura, alface, almeirão e repolho roxo (FRODER, 2005).

Não foi detectada a presença de *Salmonella spp.* em nenhuma das amostras analisadas. Esse resultado apresenta uma indicação de que a incidência de *Salmonella spp.* em hortaliças produzidas no semiárido paraibano é baixa.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudo realizado por (Souza e colaboradores 2006) que, analisando alfaces em diferentes sistemas de cultivo na cidade de Rio Branco, AC, onde constataram também ausência de *Salmonella spp.* em todas as amostras analisadas, estando assim, em conformidade com o que preconiza a Resolução nº12 de 2001/ANVISA.

Outros estudos realizados no norte da Espanha com 63 amostras de alfaces convencional e 56 amostras de alfaces orgânicas, e na Noruega em 179 amostras de alfaces cultivados organicamente não detectaram a *Salmonella spp.*

Santos et al., (2001) avaliando a presença de *Salmonella sp.* em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializada na cidade de Pará de Minas, MG, mostrou ausência desse microrganismo em todas as amostras, validando assim, essa pesquisa, onde constatou-se que as amostras de alfaces dos municípios em estudo, estão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001).

Com relação a presença de *Escherichia coli*, nas amostras de alfaces analisadas, foram identificadas um percentual de 10% (3/30) de contaminação nos municípios estudados. A *E. coli* O157: H7 tornou-se o agente etiológico bacteriano mais comum em surtos envolvendo alface e outras hortaliças verdes, o que torna-se preocupação para a saúde pública devido à gravidade de doenças agudas gastrointestinais e sobretudo às consequências que estas podem causar. Considerando que a contaminação da alface possa ocorrer desde a fazenda à mesa do consumidor, a exposição à água de irrigação, solo, alterações do solo, animais, manuseio por parte dos trabalhadores de campo e

equipamentos, fazem parte das etapas de produção no campo tornando-se iminente risco para *E. coli* O157:H7 (YANG et al., 2012).

Pesquisas realizadas mundialmente mostram elevadas contagens de indicadores de qualidade higiênico-sanitária em hortaliças minimamente processadas.

Szabo et al., (2000) analisaram 120 amostras de alface pronta para o consumo e encontraram em 76% das amostras contagens entre 5 e 7 log UFC.g⁻¹ de coliformes termotolerantes, sendo que os valores obtidos na pesquisa variaram entre 3 e 9 log UFC.g⁻¹ de coliformes termotolerantes.

Previdi et al.,(2000) identificaram ao analisar 112 amostras de vegetais minimamente processados embalados individualmente ou mistos, 56,25% de contagem total ao redor de 7 log UFC.g⁻¹, sendo que 19,64% das amostras ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação francesa (7,7 log UFC.g⁻¹). Entretanto, 95,54% das amostras apresentaram contagens de *E. coli* <1 log UFC.g⁻¹, diferentemente do encontrado na presente pesquisa.

Doenças entéricas ligadas ao consumo de produtos frescos têm aumentado (SCALLAN et al., 2011), sendo que a *E. coli* O157: H7 tem sido associada em múltiplos surtos ligados ao consumo de frutas e hortaliças frescas minimamente processadas (CDC,2006).

Silva et al., (2007) avaliaram 56 amostras de vegetais minimamente processados comercializados na cidade de Porto Alegre,RS e confirmaram a presença de *Escherichia coli* em oito amostras.

De acordo com Smanioto et al. (2006) em sua pesquisa, identificaram um percentual de 6,7% do total das amostras de couve, foi constatada a presença de coliformes termotolerantes acima do permitido, sendo confirmada a presença de *Escherichia coli*.

Para a International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSF, a presença de coliformes em alimentos indica manipulação inadequada durante o processamento, uso de equipamentos em más condições sanitárias ou ainda utilização de matéria-prima contaminada.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que, as amostras de alfaces (*Lactuca sativa* L.) analisadas produzidas no Território Rural Serra do Teixeira, PB e município de Patos, PB, respectivamente estavam impróprias para o consumo de acordo com a RDC 12/01/2001/ANVISA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUGRAIN, A.K. et al. Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. **Food Control**, v.21 , n. 5, p.760-762, 2010.

ALMEIDA, M. T. T. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes self-service no município de Limeira-SP. **Dissertação**. Piracicaba (SP), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

ARBOS, K. A. et al. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v.30, supl.1, p.215-220, 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2001.

CANTOS, GA.; SOARES, B.; MALISKA, C.; GLICK, D. Estruturas parasitárias encontradas em hortaliças comercializadas em Florianópolis, Santa Catarina. **Rev News Lab**; 66: 154-63. 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreaks of Salmonella serotype Poona infections –United States and Canada **Morbidity and Mortality Weekly Report** v. 40, p. 459-552, 2006.

ERDOGRUL, O.; SENER, H. The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolytica* cysts and *Giardia* cysts. **Food Control**, v. 16, n. 6, p. 557-560, 2005.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2001.

FRÖDER, H. Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças minimamente processadas. 93 f. **Dissertação** (Metrado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GELLI, D. S. et al. Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 39, n. 1, p. 37-43, 1979.

International commission on microbiological specifications for foods. Microorganisms in foods. 2nd ed. Toronto: University of Toronto Press; 1978.

JAY, James M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Edição. Porto Alegre: Atmed, 2005.

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

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

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

PACHECO, M.A.S.R.; FONSECA, Y.S.K.; DIAS, H.G.G.; CÂNDIDO, V.L.P.; GOMES, A.H.S.; ARMELIN, I.M.; BERNARDES, R. Condições higiênicosanitárias de verduras e legumes comercializados no Ceagesp de SorocabaSP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 50-55, out. 2002.

PREVIDI, M. P.; TOMASONI, L.; BONDI, B. Minimally processed and frozen vegetables: microbiological quality and incidence of pathogens in commercial products. **International Food Safety News**, Scotland, v. 11, n. 5, p. 11, 2002.

QUADROS, R.M.; MARQUES, S.M.T. ; FAVARO, D.A.; PESSOA, V.B.; ARRUDA, A.A.R.; SANTINI, J. Parasitos em alfaces (*Lactuca sativa*) de mercados e feiras livres de Lages- Santa Catarina. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v.1, n.2, p. 78- 84, 2008.

SOUZA, M. L.; BEZERRA, D. C. F.; FURTADO, C. M. Avaliação higiênico-sanitária de Alfaces (*Lactuca sativa*) cultivadas pelos processos convencional e hidropônico e comercializadas em Rio Branco, AC. **Higiene Alimentar**, v. 20, p.92-99, 2006.

SMANIOTO, T. F.; PIROLO, N. J.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ARRUDA, M.C. Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 68(1):150-4, 2009.

SANTOS, N.M.; SALES, E.M.; SANTOS, A.B.; DAMASCENO, K.A.; THE, T.S. Avaliação Parasitológica de Hortaliças Comercializadas em Supermercados e Feiras Livres no Município de Salvador- Ba. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.8, n.2, p.146-152, 2009.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.;
WIDDOWSON, M.-A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Food borne
illness acquired in the United States major pathogens. **Emerging Infectious
Diseases**, v.17, n.1, p.7-12, 2011.

SILVA, S.R.P.; VERDIN, S.E.F.; PEREIRA, D.C.; SCHATKOSKI, A.M.; ROTT,
M.B.; CORÇÃO, G. Microbiological quality of minimally processed vegetables
sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, n 4, p
594 , 2007.

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

YANG, Y.; YAGUANG L.; MILLNER, P.; TURNER, E.; FENG, H. Assessment of
Escherichia coli O157:H7 transference from soil to iceberg lettuce via a
contaminated field coring harvesting knife. **Int J Food Microbiology**, v. 153,p.
345–350, 2012.

(11) *Ocorrência de patógenos em frutas e hortaliças*. Available from:

https://www.researchgate.net/publication/290183848_Ocorrencia_de_patogenos_em_frutas_e_hortalicas [accessed Feb 09 2018].

CAPITULO II

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE MÉTODOS DE HIGIENIZAÇÃO DE ALFACES (*Lactuca sativa* L.) PRODUZIDAS NO SERTÃO PARAIBANO

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ALFACES (*Lactuca sativa* L.) HYGIENIZATION METHODS PRODUCED IN THE SERTÃO PARAIBANO

(Artigo científico submetido ao periódico Revista Acta Brasiliensis)

**Avaliação da eficácia de métodos de higienização de alfaces (*lactuca sativa* L.)
produzidas na região semiárida paraibana**

Evaluation of the effectiveness of lavage (*lactuca sativa* L.) hygiene methods produced
in the semi-arid region of Paraíba

Newcélia Paiva Barreto ^a, Onaldo Guedes Rodrigues ^a, Rosália Severo de Medeiros ^a, Vitória
Viviane Ferreira de Aquino ^a, Patrícia da Silva Costa ^a, Nathanael Natercio da Costa Barnabé^a
Renner Luciano de Sousa Ferraz^b.

^a Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR da Universidade Federal de Campina Grande-
UFCG, Brasil.

^b Centro de Tecnologia e Recursos Naturais-CTRN da UFCG, Brasil.

RESUMO

As hortaliças constituem alimentos importantes na dieta alimentar da população, devido ao teor de nutrientes necessários ao funcionamento adequado do organismo, como sais minerais, fibras alimentares e vitaminas, além de apresentarem ação antioxidante. 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-se soluções sanitizantes, com o intuito de reduzir e/ou eliminar os microrganismos presentes nestes alimentos. Com o objetivo de avaliar qual agente de sanitização é mais eficaz no processo de higienização de alfaces (*Lactuca sativa* L.) consumidas in natura. Realizou-se análises microbiológicas de acordo com o método padronizado pela American Public Health Association (APHA, 1995). Coletou-se 1 amostra de alface (*Lactuca sativa* L.), em feira livre no município de Patos, PB. Verificou-se a eficácia do ácido acético 6,6% (vinagre) e do hipoclorito de sódio 1% (água sanitária) na

higienização da alface (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) *in natura*. Constatou-se que o hipoclorito de sódio foi mais eficaz como agente de sanitização das folhas da alface. O ácido acético (vinagre) muitas vezes utilizado para a higienização da alface, não se mostrou totalmente eficiente, já que foram enumeradas células de coliformes termotolerantes, nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Antioxidantes, Coliformes, Hipoclorito, Hortaliças, Sanitizantes.

ABSTRACT

Vegetables are important foods in the diet of the population, due to the content of nutrients necessary for the proper functioning of the body, such as minerals, dietary fibers and vitamins, in addition to having antioxidant action. Washing the vegetables is the most common practice to obtain a safer product, however, the effectiveness of the washing operation can be increased by adding sanitizing solutions, in order to reduce and / or eliminate the microorganisms present in these foods. With the objective of evaluating which sanitizing agent is most effective in the lavage process of lettuce (*Lactuca sativa* L.) consumed *in natura*. Microbiological analyzes were carried out according to the method standardized by the American Public Health Association (APHA, 1995). A sample of lettuce (*Lactuca sativa* L.) was collected at a fair in the municipality of Patos, PB. The efficacy of acetic acid (vinegar) and sodium hypochlorite 1% (bleach) in the hygiene of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Crispa*) *in natura* was evaluated. It was found that sodium hypochlorite was more effective as a sanitizing agent for lettuce leaves. Acetic acid (vinegar), often used for the cleaning of lettuce, was not fully efficient, since thermotolerant coliform cells were enumerated in the analyzed samples.

Key words: Antioxidants, Coliforms, Hypochlorite, Vegetables, Sanitizers.

INTRODUÇÃO

As hortaliças constituem alimentos de grande importância na dieta alimentar da população, devido ao teor de nutrientes necessários ao funcionamento adequado do organismo, como sais minerais, fibras alimentares e vitaminas, além de apresentarem ação antioxidante (SILVA et al., 2005, ESTEVES e FIGUEIRÔA, 2009).

Contudo, de acordo com Azevedo (2008), o aumento no consumo destes alimentos tem gerado uma preocupação em relação à higienização recebida por estes vegetais, visto que as hortaliças apresentam um alto potencial para crescimento de microrganismos patogênicos, independentemente de como são cultivadas, e dessa forma, se tornam importantes veículos de transmissão de várias doenças infecciosas. Dentre esses alimentos, segundo Lotto (2008), as hortaliças folhosas se destacam como um dos meios mais propícios à contaminação.

Usualmente consumida crua, a alface tem no processo de higienização o único tratamento recebido entre o cultivo e o consumo. Em 1991, o surgimento da epidemia de cólera no Brasil despertou o interesse pelo assunto, tanto pelas autoridades sanitárias quanto pela população em geral. Sua utilização requer atenção quanto aos aspectos higiênico-sanitários, visto que podem trazer graves consequências à saúde dos consumidores. Diversas pesquisas relatam a possibilidade de infecção via consumo inadequado, sejam por contato com água, mãos, dejetos fecais ou ainda por falta de assepsia, transporte e manejo (VOLLKOPF et al., 2006).

Nas últimas décadas, têm-se observado um aumento de DTA'S (Doenças Transmitidas por Alimentos), sejam elas de origem bacterianas, virais, fúngicas ou parasitárias, estando relacionadas a fatores como: desenvolvimento econômico,

globalização do comércio de alimentos, intensificação da urbanização e modificações dos hábitos alimentares dos consumidores. Com referência a este último fator, destaca-se o consumo de alimentos frescos ou in natura, prontos ou semiprontos, e de refeições fora do domicílio. Esses hábitos são apontados como favorecedores do surgimento de novos casos (ORLANDI et al., 2004).

Por conseguinte, a sanidade das hortaliças que são consumidas cruas é fator relevante à saúde devendo ser garantida também pela desinfecção com produtos químicos que tenham ação eficaz na eliminação, redução e ou remoção de microbiota presente (GERMANO et al.,2008). Sabe-se que estes vegetais podem veicular algumas doenças intestinais, pois muitas vezes são transportadores de microrganismos, protozoários, helmintos e artrópodes. Isto se deve principalmente às condições insalubres de cultivo como, por exemplo, água de irrigação contaminada, uso de adubos com substâncias contaminadas por dejetos fecais e outros fatores como animais domésticos presentes na área de plantio (GERMANO,2008).

Métodos de limpeza e sanitização de hortaliças envolvem a aplicação de água, detergentes e tratamento mecânico das superfícies por escovas ou sprays seguidos por enxágue com água potável. O passo de enxágue pode incluir um tratamento de sanitização. É importante assegurar que a água utilizada seja de boa qualidade para não se tornar um veículo de contaminação (ANTUNES, 2009). Dentre os produtos permitidos para desinfecção dos alimentos estão, o hipoclorito de sódio ou cálcio a 2,0 –2,5%, hipoclorito de sódio a 1% e cloro orgânico, que são utilizados em concentrações variando de 100 a 250 ppm. Tais produtos devem estar regularizados no órgão competente do Ministério da Saúde, além disso, devem ser aplicados de forma a evitar a presença de resíduos no alimento preparado (BRASIL, 2004).

Os sanitizantes mais utilizados são os compostos clorados como o hipoclorito (água sanitária), por serem considerados mais baratos e eficazes, todavia pode ser utilizado outro produto desinfetante como o vinagre, mas um dos preconceitos mais comuns ao uso do vinagre é o de ser apenas, um condimento, no entanto, este pode ser utilizado como agente sanitizante (FONTANA, 2006).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar qual agente de sanitização é mais eficaz no processo de higienização de alfaces (*Lactuca sativa* L.) consumidas in natura.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação das espécies

A coleta foi realizada na feira livre, no centro da cidade de Patos, PB, nas primeiras horas da manhã, onde produtores rurais de cidades circunvizinhas comercializam seus produtos.

Um exemplar da amostra coletada foi prensada e posta para secagem em estufa a 60 °C para confecção das exsiccatas, seguindo-se as técnicas usuais para herborização recomendadas por Forman e Bridson (1989), e registradas no Programa Brahm. O material coletado foi depositado no Herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande, em Patos-PB.

Análises morfológicas para as identificações, descrições das espécies foram realizadas com auxílio de chaves analíticas, diagnoses encontradas na bibliografia e comparação com as exsiccatas do herbário do CSTR. A grafia dos táxons foi verificada na base de dados do MOBOT (2012).

Obtenção e Processamento das Amostras

Coletou-se uma unidade amostral de alface (*Lactuca sativa* L. var *crispa*), adquirida em feira livre localizada no centro da cidade de Patos, PB, no mês de dezembro de 2017.

A unidade amostral foi o “pé” de alface (*Lactuca sativa* L.), variedade “crespa”, independentemente de peso e tamanho, cultivada pelo método tradicional de cultivo.

No procedimento de coleta da hortaliça, utilizou-se saco plástico de primeiro uso contendo as informações do local de coleta, horário, data, espécie/variedade. O transporte ocorreu em caixa térmica evitando o atrito e possíveis danos, sob processo de refrigeração (gelo reciclável) não deixando que ultrapassasse os 8 °C. Do local de coleta ao início das análises durou em média duas horas. Em seguida a amostra foi encaminhada ao Laboratório de Microbiologia da UACB, UFCG, para prosseguimento das análises microbiológicas.

Primeiramente as folhas da alface foram separadas, pesadas e distribuídas 25 g em cada um dos três recipientes contendo 200ml de água destilada. No primeiro recipiente foram adicionados 25g de folhas de alface sem lavagem (grupo controle positivo); no segundo recipiente adicionou-se 200ml de água destilada e 50 ml de ácido acético (vinagre) e 25g de folhas de alface; no terceiro recipiente adicionou-se 200ml de água destilada e 25g de folhas de alface e 3 ml de hipoclorito de sódio (uma colher de sopa por litro de água), de acordo com a Portaria nº 1.210 (SÃO PAULO, 2006) e no quarto recipiente adicionou-se 200ml de água de torneira e 25g de folhas de alface. Após trinta minutos foram realizadas as análises microbiológicas da água dos recipientes onde estavam as folhas da alface, utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) para a enumeração de coliformes termotolerantes.

Figura1. Métodos de higienização utilizados na amostra.



Fonte: Acervo próprio

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram fundamentadas na determinação do número mais provável, pela técnica de fermentação em tubos múltiplos de acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1991) e American Public Health Association (APHA,1995). Foram realizadas as análises exigidas pela RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, ou seja, contagem de coliformes a 45°C termotolerantes e coliformes totais (ANVISA, 2001).

Preparo das Amostras para Análises Microbiológicas

Para realização das análises de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*, transferiu-se 90g da amostra para um erlenmayer contendo 90 ml de caldo lactosado estéril, em seguida replicou-se para os tubos de ensaio com tubos de Duhan

invertidos, para proceder a contagem de coliformes totais e fecais, obtendo-se desta forma a diluição 10^{-1} . Dessa diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições subsequentes (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) três tubos para cada diluição, levamos os tubos em estufa bacteriológica durante 24 - 48 horas.

Técnica do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais

Essa técnica consta de duas fases distintas: o teste presuntivo, onde se busca detectar a presença de microrganismos fermentadores de lactose e onde é possível recuperar células injuriadas; e o teste confirmativo, onde se determina a população real de coliformes totais (CT) e coliformes fecais (CF) (APHA, 1995).

Para a prova presuntiva foram utilizados as diluições de 10^{-1} à 10^{-5} , sendo semeadas alíquotas de 1 ml em uma série de 3 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Incubou-se os tubos a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h e verificou-se o crescimento dos microrganismos através da produção de gás nos tubos de Duham e/ou turvação do meio. Figura 2.

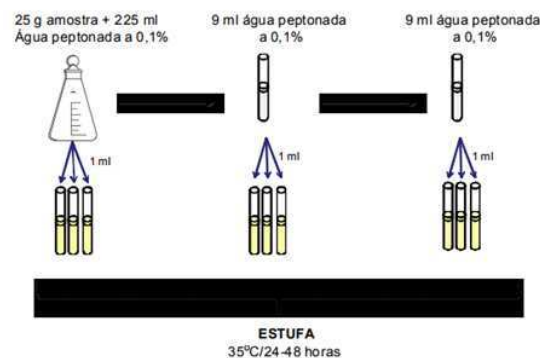


Figura 2. Procedimento para prova presuntiva de coliformes pelo método do Número Mais Provável.

Dos tubos positivos, foi realizado o teste para a confirmação de CT. Para tanto, os tubos positivos do caldo LST foram repicados para três séries de três tubos contendo caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% (CVBLB), os quais foram incubados a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Para a prova confirmatória de CF, foram repicados os tubos positivos do caldo LST para tubos contendo caldo *E. coli* (EC) incubando-se por $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h, em banho-maria com agitação. A presença de gás indicou a positividade do tubo para a presença de CF. O cálculo do NMP/g foi determinado com auxílio da tabela de NMP- séries de três tubos.

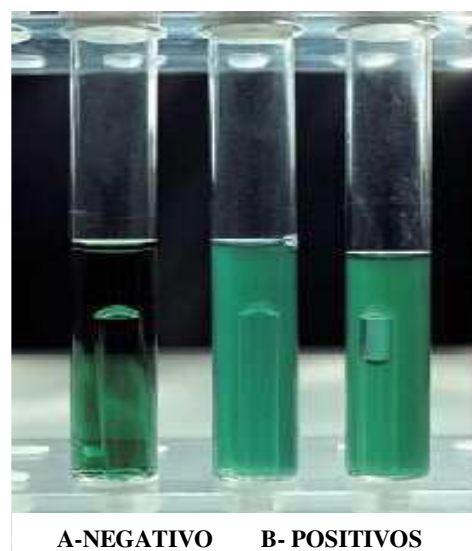
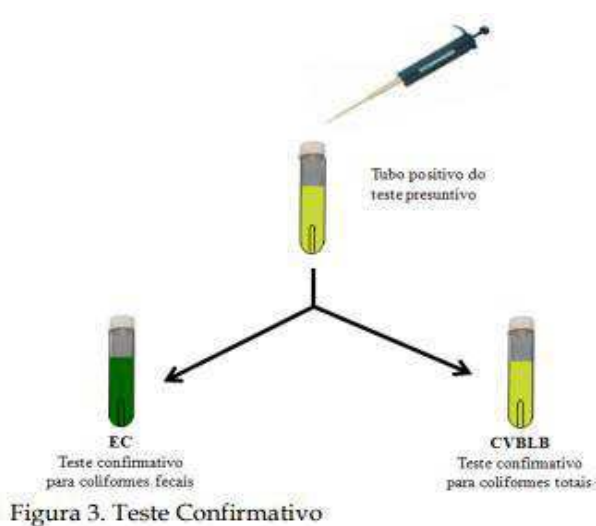


Figura 3 – Procedimento para prova confirmatória de coliformes pelo método do

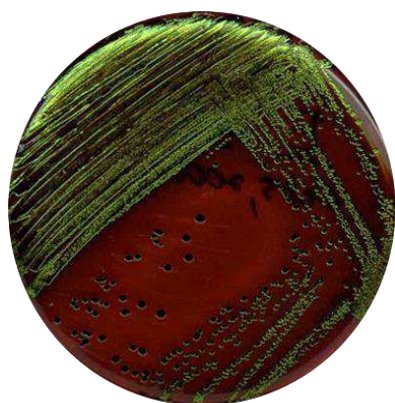
Número Mais Provável.

OBS: A- Tubo com resultado negativo para coliformes fecais. B- Tubo com resultado positivo para coliformes fecais, evidenciado pela turvação do meio de cultura e formação de gás no interior do tubo de Duhan.

O cálculo do NMP/g foi determinado com auxílio da tabela de NMP- séries de três tubos.

Em seguida realizou-se os testes bioquímicos para isolamento de *Escherichia coli* e outras enterobactérias. A partir dos tubos positivos do Caldo EC estriou-se, com alça de platina, em placas de Petri contendo meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e em seguida incubadas a 35°C/24 h. Após o crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) características, nucleadas com centro negro e brilho verde metálico, estas foram transferidas (três a cinco UFC de cada placa de Petri), com auxílio de alça bacteriológica, para tubos inclinados contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) que foram incubados a 35°C/18-20 h. Depois de incubados transferiu-se alíquotas da cultura do PCA, por meio de alça bacteriológica para meios de cultura adequados para realização de provas bioquímicas para a identificação de *E. coli*. Os testes realizados foram: Teste do Indol; Teste de Voges-Proskauer; Teste do Vermelho de Metila e Teste do Citrato (IMViC). Os resultados obtidos foram comparados com os padrões da legislação vigente, RDC 12/2001 (ANVISA, 2001).

Figura 4. Placa de Petri, contendo meio EMB, após crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) características, nucleadas com centro negro e brilho verde metálico e tubos de ensaio contendo PCA e seus respectivos resultados positivo e negativo.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados dos testes realizados, o teste com o hipoclorito de sódio para descontaminação das folhas de alface apresentou resultados negativo para coliformes termotolerantes e coliformes totais. O teste que utilizou água com vinagre apresentou coliformes termotolerantes, observando-se contagens aceitáveis conforme preconiza a legislação brasileira ($1,1 \times 10^2$ NMP/g) (BRASIL, 2001). Contudo os testes representados pelo grupo controle positivo sem nenhum método de higienização e o grupo que utilizou apenas água de torneira apresentaram um nível de contaminação considerável de coliformes termotolerantes, apresentando contagem acima do permitido pela legislação brasileira ($1,1 \times 10^2$ NMP/g) (BRASIL, 2001) Tabela 1.

Tabela 1. Resultado das análises microbiológicas para determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes (NMP/g) na amostra de alface de cultivo tradicional e das etapas de higienização.

PROCEDIMENTOS	COLIFORMES TOTAIS NMP/g	COLIFORMES TERMOTOLERANTES	RDC12/2001 ANVISA
SEM LAVAGEM	1100	210	Impróprio p/consumo
H ₂ O+VINAGRE	>24	0,93	Próprio p/ consumo
H ₂ O+HIPOCLORITO	00	00	Próprio p/ consumo
H ₂ O TORNEIRA	>2400	093	Impróprio p/consumo

Fonte: A autora

Adami e Dutra (2011) ao estudar o efeito do vinagre na eliminação de coliformes termotolerantes presentes na alface verificaram que as amostras após a sanitização apresentaram uma redução na quantidade de coliformes, entretanto não de forma satisfatória, pois as amostras ficaram fora do padrão estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001).

Nascimento e Alencar (2014) analisaram a eficácia da solução do hipoclorito de sódio a 1%, e do ácido acético a 6,6% (vinagre) na higienização das hortaliças in natura alface (*Lactuca sativa* L. var *crispa*), couve manteiga (*Brassica oleracea*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e coentro (*Coriandrum sativum*), e constataram que a solução de hipoclorito de sódio a 1% e a solução de ácido acético a 6,6% apresentaram ação antiparasitária similares evidenciando-se uma discreta eficiência da solução de hipoclorito de sódio em relação à solução de ácido acético.

Corroborando com a presente pesquisa, Oliveira (2005), ao analisar os métodos de higienização de vegetais empregados em restaurantes de Porto Alegre- RS, após os tratamentos com hipoclorito de sódio, durante 30 minutos, verificou que houve um

decréscimo nas contagens de coliformes termotolerantes, em relação à população inicial das amostras de alface analisadas, comprovando a eficácia desse método sanitizante.

Nascimento e Silva (2010) obtiveram resultados parecidos ao analisar a eficácia do cloro a 200 ppm na higienização de uvas, onde todas as suas amostras demonstraram a diminuição de coliformes termotolerantes comparados a contagem inicial.

De acordo com Vitti e colaboradores (2004), tem sido preconizado que alimentos com contagens microbianas de psicotróficos acima de 10^5 UFC/g podem ser considerados impróprios para consumo humano pela perda do valor nutricional, alterações organolépticas e riscos de contaminação. O risco de contaminação por patógenos psicotróficos está associado à presença de microrganismos como *Listeria monocytogenes*.

Gomes et al., (2011) avaliou metodologias para a higienização de hortaliças de diferentes fontes de adubação, utilizando ácido acético e hipoclorito. Com isso ele pode concluir que o desinfetante mais eficiente na remoção de parasitas em alfaces foi o hipoclorito de sódio, sendo 100% eficaz para todos os tipos de adubação (GOMES et al., 2011)

É importante ressaltar que muitos microrganismos deterioradores são psicotróficos e a presença elevada desse grupo de microrganismos pode contribuir para redução da vida de prateleira de alimentos minimamente processados e indicar também que as operações de limpeza e sanitização empregadas durante o processamento não foram eficientes. O uso de sanificantes na água de lavagem, ao mesmo tempo em que reduz a carga microbiana inicial de 1-2 ciclos logarítmicos, pode favorecer o crescimento do patógeno pela diminuição da microbiota competitiva (ZAGORY, 2001).

A falta de eficácia do sanificante usado para descontaminar a superfície de frutas e vegetais crus tem sido amplamente atribuída à inabilidade dos componentes ativos da solução em inibir ou inativar as células microbianas (BEUCHAT, 2002).

Outros fatores, como a concentração do sanitizante e o tempo de contato com a superfície a ser desinfetada, também contribuem para a eficiência ou não do processo de limpeza e sanitização (REGO; FARO, 2001).

Para Sant'Ana e colaboradores (2002), a sanitização de frutas e vegetais, sob o ponto de vista da segurança alimentar, é considerada etapa crítica do processamento, assim como os aspectos de higiene pessoal na manipulação do produto.

Takayanagui et al., (2006) afirmaram que a contaminação de hortaliças ocorre de um modo geral, na horta, por meio da utilização de água de irrigação ou adubos contaminados, além da manipulação inadequada nos pontos de venda e transporte desses produtos. A lavagem dos vegetais é a prática mais comum para se obter um produto mais seguro, entretanto, a eficácia na operação de lavagem pode ser aumentada acrescentando-se soluções sanitizantes, objetivando a redução e/ou eliminação de microrganismos presentes nestes alimentos (BERBARI et al., 2001).

As pesquisas realizadas para averiguar a qualidade higiênico-sanitária das hortaliças, incidem em sua maioria nos locais de distribuição e comercialização das mesmas. Sendo assim são raros os estudos desenvolvidos durante o cultivo e cadeia produtiva, que representam uma boa parcela de contaminação, devido às condições que essas hortaliças estão expostas (SANTOS, 2007).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que, entre os testes de higienização de hortaliças avaliados, o mais eficaz foi o grupo com a solução de hipoclorito de sódio a 1%, onde foi possível observar ausência da carga microbiana na amostra analisada.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Campina Grande- UFCG. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pelo fornecimento de bolsa à primeira autora.

Referências

- ADAMI, A. A. V.; DUTRA, M. B. L. 2011. Análise da eficácia do vinagre como sanitizante na alface (*Lactuca sativa*, L.). REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 3, p. 134-144.
- ANTUNES, M. A. 2009. Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos na cadeia de produção da alface (*Lactuca sativa*). Propriedade de Santo Antônio- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, p. 30-36.
- AZEVEDO, E. D. 2008. Reflexões sobre riscos e o papel da ciência na construção do conceito de alimentação saudável. Revista de Nutrição. v. 21, n. 6, p. 717-723.
- BELINELO, V. J.; GOUVÊIA, M. I.; COELHO, M. P.; ZAMPROGNO, A. C.; FIANCO, B. A.; OLIVEIRA, L. G. A. 2009. Enteroparasitas em hortaliças

comercializadas na cidade de São Mateus, ES, Brasil. Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar, Umuarama, v. 13, n. 1, p. 33-36, jan./abr.

BERBARI, S.A.G. et al.2001. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.21, p.197-201.

BEUCHAT, L. R.2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on row fruits and vegetables. Microbes and Infection, v. 4, n. 4, p. 413-423.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviço de alimentação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>. Acesso em 14 dez. 2017.

CARVALHO, P. G. B. et al.2006. Hortaliças como alimentos funcionais. Horticultura Brasileira, v. 24, n. 4, p. 397- 404.

ESTEVES, F.A.M., FIGUEIRÔA, E.O. 2009.Detecção de enteroparasitas em hortaliças comercializadas em Feiras Livres do município de Caruaru- PE. Revista Baiana Saúde Pública abr.-jun.;33(2):184-93.

- LOTTO, M. C. 2008. Avaliação da contaminação de alface (*Lactuca sativa*) por coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em sistemas de cultivo orgânico e convencional. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Carlos, Araras, São Paulo.
- MONTANHER, C.C.; CORADIN, D.C. 2007. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes Self-service por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. Revista Estudos de Biologia. v. 29, p. 63-71.
- NASCIMENTO, D.E.; ALENCAR, F.L.S. 2014. Eficiência antimicrobiana e antiparasitária de desinfetantes na higienização de hortaliças na cidade de Natal-RN. Ciência e Natura. v. 36, n. 2, p.92-106,.
- NASCIMENTO, M. S. 2002. Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras. 2002. 115f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.
- NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N. 2010. Tratamentos químicos na sanitização de morango (*Fragaria vesca* L). Brazilian Journal of Food Technology. v. 13, n. 1, p. 11-17.
- OLIVEIRA, A. B. A. 2005. Comparação de diferentes protocolos de higienização de alface (*Lactuca sativa*) utilizada em restaurantes de Porto Alegre- RS. 2005. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- RS.
- ORLANDI, P.A.; CHU, D-M.T.; BIER, J.W.; JACKSON, J.G. 2002. Parasites and the food supply. Food Technol 56: 72-81.

REGO, J. S.; FARO, Z. P. 2001. Manual de limpeza e desinfecção para unidades produtoras de refeições. São Paulo, SP: Varela.

SANT'ANA, A. et al.. 2002. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 101, p. 50- 55.

VITTI, M. C. D. et al., 2004. Aspectos fisiológicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 10, p. 1027-1032.

VOLLKOPF, P.C.P.; LOPES, F.M.R.; NAVARRO, I.T. 2006. Enteroparasites occurrence in lettuce samples (*Lactuca sativa*) commercialized in Porto Murtinho - MS. *ARQUIVOS DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS E ZOOLOGIA DA UNIPAR*, v. 9, n. 1, p. 37-40.

ZAGORY, D. 2001. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology*, v. 15, n. 3, p. 313- 321.

ANEXOS