



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa*) POR
COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *Escherichia coli* EM SISTEMAS DE
CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

MARIANA DE CASTRO LOTTO

Araras - SP
2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa*) POR
COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *Escherichia coli* EM SISTEMAS DE
CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

MARIANA DE CASTRO LOTTO

ORIENTADOR: PROF. Dr. PEDRO JOSÉ VALARINI

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial à obtenção do título de
**MESTRE EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL**

Araras - SP
(2008)

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L884ac

Lotto, Mariana de Castro.

Avaliação da contaminação de alface (*Lactuca sativa*) por coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em sistemas de cultivo orgânico e convencional / Mariana de Castro Lotto. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

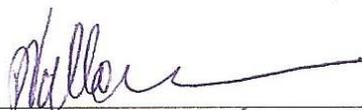
1. Alface. 2. Coliformes. 3. *Escherichia coli*. 4. Cultivo orgânico. 5. Cultivo convencional. I. Título.

CDD: 635.52 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE
MARIANA DE CASTRO LOTTO

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 15 DE OUTUBRO DE 2008.

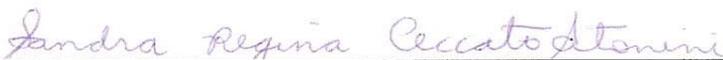
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. PEDRO JOSÉ VALARINI

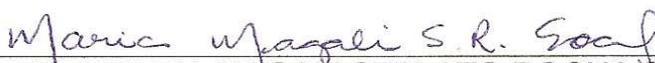
ORIENTADOR

PPGADR/EMBRAPA MEIO AMBIENTE



Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

PPGADR/UFSCar



Profa. Dra. MARIA MAGALI STELATO ROCHA SOARES

PUC/CAMPINAS

Aos meus pais José Renato e Márcia por nunca medirem esforços em minha educação.

Ao Meu marido Pablo pelo carinho, dedicação e paciência que me deram forças para prosseguir.

Às minhas irmãs, Renata e Maria Fernanda pela compreensão durante o período de execução deste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força para superar as dificuldades vivenciadas na realização deste projeto;

À Minha família que acreditou e me apoiou em todos os momentos;

Ao Pedro José Valarini pela orientação, confiança e oportunidades de crescimento profissional oferecidos;

Ao Dr. Itamar Soares de Melo e o Dr. Marcelo Morandi, pelo apoio;

Aos técnicos João Luiz, Márcia e Rosely do laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente por estarem sempre dispostos a me ajudar;

Ao meu grande amigo Pietro Agostini, por estar presente em todas as horas, sempre disposto a me auxiliar;

Aos demais amigos e alunos do Laboratório de Microbiologia Ambiental: Fernanda, Sarah, Luciana Reyes, Marcela, Flávia, Luciana Ávila, Liliana, Zayame, Alexandre Sereda, Eduardo, Elida, pelo apoio e a convivência alegre demonstrado;

À todos os funcionários da Embrapa Meio Ambiente e da Universidade Federal de São Carlos (campus de Ciências Agrárias- Araras);

Ao Victor e à Maria Amélia, funcionários da biblioteca da Embrapa Meio Ambiente, pela ajuda nas referências;

Aos coordenadores e professores do curso de mestrado de Agroecologia e Desenvolvimento Rural, pela acolhida e inestimável contribuição fornecida na minha formação;

À Prof. Magali Stelato Soares, pela atenção prestada quando precisei;

Aos companheiros do Curso de mestrado de Agroecologia e Desenvolvimento Rural, pelo agradável convívio na trajetória do dia a dia;

À Fátima e ao Jeferson pelo apoio prestado durante este trabalho;

Enfim, à todos que não foram mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

"Não basta dar os passos que nos devem levar um dia ao objetivo, cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si mesmo, ao mesmo tempo que nos leva para diante."

Johann Goethe

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Alface	03
2.2 Sistemas de cultivo	05
2.2.1 O cultivo hidropônico	05
2.2.2 O cultivo convencional	06
2.2.3 O Cultivo orgânico	07
2.3 Certificação	09
2.4 Segurança Alimentar	10
2.5 Fontes de contaminação microbiológica no campo	11
2.5.1 Insumos naturais	11
2.5.2 Hábitos inadequados de higiene	12
2.5.3 Água de irrigação	13
2.6 Microrganismos indicadores	15
2.6.1 Coliformes totais	17
2.6.1.1 Coliformes termotolerantes	18
2.6.1.2 <i>Escherichia coli</i>	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Propriedades selecionadas	22
3.2 Coletas de materiais para análises	22
3.2.1 Água de irrigação e pré-lavagem	23
3.2.2 Alface	23
3.3 Análise Microbiológica	23
3.3.1 Análise Microbiológica da água	23
3.3.2 Análise Microbiológica da alface	24
3.3.3 Teste confirmativo para coliformes termotolerantes	25
3.3.4 Teste confirmativo e serie bioquímica para <i>Escherichia coli</i>	25
3.4 Avaliação das condições ecológicas das propriedades	27

3.5 Identificação das bactérias isoladas pela técnica de tubos múltiplos para <i>Escherichia coli</i> através da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular, MIDI-----	27
3.6 Microscopia eletrônica de varredura-----	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	30
5 CONCLUSÕES-----	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	50
ANEXOS-----	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de identificação das doze propriedades selecionadas, no período de junho a dezembro de 2007 -----	22
Tabela 2. Índices médios de coliformes termotolerantes e o seu Intervalo de confiança 95% em alface não lavada e lavada em NMP/g, coletadas nas épocas 1 e 2 sob cultivo orgânico e convencional. -----	34
Tabela 3. Porcentagem de propriedades com níveis de coliformes termo tolerantes acima do estabelecido pela ANVISA (100 NMP/g). -----	35
Tabela 4. Índices médios de <i>E. coli</i> e o seu Intervalo de confiança 95% em alface não lavada e lavada em NMP/g, coletadas nas épocas 1 e 2 sob cultivo orgânico e convencional -----	36
Tabela 5. Práticas agrícolas e não agrícolas utilizadas e Condições ambientais das propriedades de Cultivo orgânico e convencional. -----	38
Tabela 6. Identificação, de bactérias isoladas de alface lavado e não lavado e água de irrigação e lavagem através de perfil de ácidos graxos -----	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de coliformes termo tolerantes em NMP/ml e seus intervalos de confiança 95%, em água de irrigação (AI) e nas épocas 1 e 2 em sistema de cultivo orgânico-----	30
Figura 2. Concentração de coliformes termo tolerantes em NMP/g e seus intervalos de confiança 95%, em água de pré-lavagem (AL) e água de irrigação nas épocas 1 e 2 em sistemas de cultivo convencional -----	31
Figura 3. Concentração de <i>E. coli</i> em NMP/g e seus intervalos de confiança 95%, em água de pré-lavagem e água de irrigação nas épocas 1 e 2 em sistema de cultivo orgânico. -----	31
Figura 4. Concentração de <i>E. coli</i> em NMP/g e seus intervalos de confiança 95%, em água de pré-lavagem e água de irrigação nas épocas 1 e 2 em sistema de cultivo convencional. -----	32
Figura 5. Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alface lavada pertencente ao cultivo convencional.. -----	42
Figura 6. Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alface não lavada pertencente ao cultivo convencional.-----	43
Figura 7. Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alface lavada pertencente ao cultivo orgânico -----	44
Figura 8. Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alface não lavado pertencente ao cultivo orgânico. -----	45

ANEXO

Figura 9. Propriedade de Sistema de Cultivo Convencional.-----	71
Figura 10. Chiqueiro próximo a horta onde foram coletadas amostras de alface -----	71
Figura 11. Propriedade de Sistema de Cultivo Orgânico.-----	72
Figura 12. Fotos dos experimentos -----	73

RESUMO

A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, sendo classificada como um importante alimento para a população por ser uma rica fonte de vitaminas. Em função das práticas adotadas, o seu cultivo pode ser orgânico ou convencional. No entanto, alface pode ser um veículo transmissor de microrganismos patogênicos ao homem, como coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, uma vez que se encontra em contato com esses contaminantes presentes freqüentemente no solo, na água, nos insumos naturais (cama de frango) propiciando o desenvolvimento e a sobrevivência dos mesmos. O objetivo deste trabalho foi avaliar, quantitativamente, a presença de coliformes termotolerantes e de *E.coli* em água de irrigação e de pré-lavagem, assim como, o produto alface não lavada e pré-lavada, cultivada sob cultivo orgânico e convencional, em relação à recomendação da ANVISA. As coletas foram realizadas em dez propriedades, cinco de cultivo orgânico e cinco de cultivo convencional, localizadas nas cidades de Ibiúna, Jaguariúna, Campinas e Morungaba - SP. Em laboratório, as amostras foram submetidas à análise de tubos múltiplos e série bioquímica e procedeu-se a avaliação pela técnica de contagem do Número Mais Provável. Os resultados mostraram um alto índice de coliformes termotolerantes e *E. coli* na água de irrigação, sendo um fator importante pela contaminação da alface, independente do sistema de cultivo. Todavia, o cultivo convencional apresentou índices de contaminação por esses microrganismos na água superiores ao do cultivo orgânico. No produto alface, a pré-lavagem contribuiu para a redução da contaminação por

coliformes termotolerantes e *E. coli*, entretanto a contaminação pelo primeiro foi mais alta em ambos os sistemas de cultivos. Além disso, outras práticas utilizadas nas propriedades como a higiene pessoal, o uso de adubos compostados inadequados e a presença de animais nas áreas de cultivo são fontes de contaminação.

Palavras chave: alface, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, cultivo orgânico, cultivo convencional, água de irrigação e água de pré lavagem.

ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa*) is the most consumed vegetable in Brazil, being classified as an important food, to be a rich source of vitamins. According to the practices adopted, its cultivation can be organic or conventional. However, lettuce can be a transmitter of pathogenic microorganisms to humans, as thermotolerant coliforms and *Escherichia coli*, since it is in contact with these contaminants often present in soil, water, in natural inputs (poultry litter) providing their development and survival. This research aimed to assess quantitatively the presence of thermotolerant coliforms and *E. coli* in water for irrigation and washing water, and the not washed and washed lettuce, grown under organic and conventional systems. The samples were collected in ten farms, five under organic and five under conventional systems, located at the cities of Ibiúna, Jaguariúna, Campinas e Morungaba - SP. In the laboratory, the samples were submitted to the analysis by the technique of counting the Most Probable Number. The results show that water for irrigation was considered one of the main factors responsible for contamination of lettuce, as showed by the presence of high rate of thermotolerant coliforms and *E. coli*, independent of the cultivation system. However, the conventional system had been showing levels of contamination by thermotolerant coliforms and *E. coli* in water higher than in organic system. In lettuce, pre washing contributed to the reduction of contamination by thermotolerant coliforms and *E. coli* in the product; however contamination by thermotolerant coliforms was considered high in the both cultivation systems. Moreover, others practices used in the farm such as

personal hygiene, the inappropriate use of compost and the presence of animals in the areas of crops are source of contamination.

Key words: lettuce, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, organic system, conventional system, water for irrigation and washing water.

1. INTRODUÇÃO

Em busca de um modo de vida saudável, consumidores conscientes vêm buscando substituir alimentos cultivados com a utilização de agrotóxicos na agricultura convencional, por uma alternativa mais segura, tanto para a sua própria saúde como para a preservação do meio ambiente. Estas razões motivaram algumas pessoas, em todo o mundo, a utilizar alimentos organicamente cultivados.

A agricultura orgânica tem como objetivo promover a saúde do meio ambiente, preservar a biodiversidade e as atividades biológicas do solo, através de uso de práticas de manejo, sendo excluída a adoção do uso de substâncias químicas e outros materiais sintéticos que causam desequilíbrio no ecossistema. Por outro lado, a agricultura orgânica vem sendo questionada sobre a qualidade de seus alimentos quando se tratam de aspectos microbiológicos devido ao uso de adubos como compostos provenientes, principalmente, de fezes animais em grande quantidade.

Independentemente do sistema de cultivo, hortaliças apresentam um alto potencial para crescimento de microrganismos patogênicos, constituindo um importante meio de transmissão de várias doenças infecciosas. Dentre

esses alimentos, as hortaliças folhosas se destacam como um dos veículos de contaminação mais significativos.

Durante a produção de alimentos de origem vegetal, diversas fontes podem ser apontadas como responsáveis pela contaminação microbiana em hortaliças folhosas, sendo elas a água de irrigação contaminada; o manuseio; a utilização de adubos orgânicos mal processados; a presença de animais domésticos ou selvagens presentes nas proximidades das hortas; a lavagem pós-colheita; o armazenamento inadequado; contaminações de caixas; falhas no processo de armazenamento e a contaminação cruzada com outros alimentos.

Devido à importância do consumo de alimentos vegetais pela população, pelo seu valor nutricional, baixo valor calórico e rica fonte de fibras, é necessária a adoção de novas estratégias em todas as etapas de produção, ocorrendo assim, a prevenção de patógenos de origem alimentar.

Considerando a importância do risco de contaminação de alimentos produzidos na agricultura e a existência de níveis de tolerância, o objetivo da pesquisa foi quantificar a presença de coliformes termotolerantes e *E. coli* em águas de irrigação e lavagem, bem como, no produto alface, pertencentes a cultivos orgânicos e convencionais e correlacionar com o manejo utilizado na propriedade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família Cichoriaceae, tendo como centro de origem o Oriente Médio. Próximo ao ano de 2.500 A.C., a alface já era conhecida pela IV Dinastia do Egito antigo, sendo encontradas representações de pinturas da espécie em tumbas. No século XV a cultura foi introduzida na Europa Ocidental, sendo descritas algumas cultivares como Lisa, Romana e Bavária. Em 1494, provavelmente foi levada para a América, junto à expedição de Cristóvão Colombo (RYDER, 2002), e no Brasil chegou no século XVI, através da vinda dos portugueses (TRANI *et al.*, 2005).

Planta anual, herbácea, que possui caule reduzido, não ramificado com folhas grandes, lisas ou crespas, verdes ou roxas, a alface apresenta seu sistema radicular ramificado e superficial, podendo atingir no máximo apenas 25 cm do solo. As cultivares podem ser agrupados didaticamente em seis grupos: Repolhuda-manteiga, Repolhuda-crespa ou Americana, Solta-lisa, Solta-crespa, Mimosa e Romana (FILGUEIRA, 2000).

É uma hortaliça mundialmente popular, representando cerca de 50% do total consumido em todo o mundo (FILGUEIRA, 2000). No Brasil, a área cultivada é cerca de 35.000 hectares com a produção anual de

aproximadamente dois milhões de toneladas, tendo como destaque o estado de São Paulo com 7.300 hectares plantados (COSTA & SALA, 2005), com a produção de cinco milhões de engradados contendo nove dúzias cada um (IEA, 2007), possuindo o consumo per capita anual de 0,67 Kg (IBGE, 2008). Em Estudos realizados pela EMATER DF (2007), constatou-se que a produtividade da alface pertencente ao sistema convencional no Brasil foi de 15.000kg/ha (3.000cx.5kg), entretanto a do sistema orgânico foi de 12.500kg/ha (2.500cx.5kg).

Por possuir baixo valor calórico e ser uma rica fonte de fibras, a alface qualifica-se para diversas dietas, constituindo-se um componente imprescindível das saladas dos brasileiros (FERNANDES *et al.*, 2002; SANTANA *et al.*, 2006). Além disso, a alface possui beta-caroteno, folato, vitamina C, cálcio, ferro e potássio, entre outras propriedades, e também considerada como ótimo calmante e remédio contra insônia (ANDRADE JUNIOR & KLAR, 1997).

Considerado um alimento básico para a população, a alface pode ser um veículo transmissor de microrganismos patogênicos ao homem, uma vez que se encontra em contato com esses contaminantes presentes freqüentemente no solo, na água, nos insumos naturais, propiciando o desenvolvimento e a sobrevivência dos mesmos. Esta provável contaminação pode mudar as características físicas e químicas no alimento, podendo ser responsáveis por intoxicações e infecções (BARUFALDI *et al.*, 1984; ARAÚJO *et al.*, 1999; TAKAYANAGUI *et al.*, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2003; PAULA *et al.*, 2003; SANTANA, *et al.*, 2006).

Apesar de surtos de intoxicação alimentícia estarem associados a carnes, frangos, frutos do mar e laticínios, uma revisão realizada pelo centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA indicou que frutas e hortaliças representam o mesmo risco de contaminação. Isto se dá em consequência do alto potencial para o crescimento de microrganismos patogênicos devido às condições de cultivo, colheita, armazenamento e distribuição dos mesmos. Os microrganismos patogênicos capazes de promover doenças alimentares são bactérias, vírus e parasitas, logo, as

bactérias são a maior preocupação em termos de doenças graves e número de pessoas com risco de infecção a nível mundial (THINEY, 2001).

O cultivo da alface vem sendo praticado de três diferentes formas: hidropônicas, convencionais e orgânicas, apresentando diferenciadas características na produção e nas práticas de manuseio do produto, as quais podem influenciar nas propriedades nutricionais dessa hortaliça (MIYAZAWA, et al., 2001).

2.2 Sistemas de cultivo

2.2.1 Cultivo hidropônico

A hidroponia é um sistema de cultivo onde as plantas crescem fixadas em substratos, ou colocadas em canais de cultivo, por onde circula uma solução nutritiva em meio aquoso com os nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta, e de acordo com a necessidade de cada espécie vegetal. Esta solução nutritiva é composta por micronutrientes (B, Cl, Fe, Cu, Mn, Mo e Zn) macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) a qual necessita de um controle adequado do pH e da condutividade elétrica, para manter suas características iniciais de balanceamento e permitir que as plantas cresçam sob melhores condições possíveis, evitando o acúmulo excessivo de nitrato (COSTA, 2001).

A alface é a hortaliça mais cultivada nos sistemas hidropônicos devido ao seu pioneirismo como cultura hidropônica, por possuir um ciclo curto de produção (30 a 35 dias), ter fácil aceitação no mercado consumidor e por permitir o seu cultivo durante o ano todo (KOEFEENDER, 1996; OHSE *et al*, 2001; ZANELLA *et al*, 2008).

Existem diversos tipos de sistema hidropônico, os quais determinam estruturas com características próprias, sendo os mais utilizados: Sistema NFT (Nutrient film technique) ou técnica do fluxo laminar de nutrientes; Sistema DFT (Desp film technique) ou cultivo na água ou “floating” e Sistema com substratos (FERNANDES *et al.*, 2002).

No entanto, quando comparada com outros tipos de cultivo, o sistema hidropônico possui vantagem em relação ao sistema de cultivo convencional, como a eficiência no uso da água, a redução da utilização de fertilizantes e o menor impacto ambiental. Quando comparada com o sistema orgânico, suas desvantagens tornam-se evidentes, pois apresenta fatores que não as torna um sistema sustentável, como: alto investimento inicial de materiais, utilização de energia elétrica, conhecimentos técnicos elevados, maior facilidade de disseminação de patógenos pela própria solução nutritiva, utilização de produtos químicos (SEDIYAMA, 1999; FERNANDES *et al.*, 2002; SILVA & LIMA NETO, 2007). Além disso, a produção de hortaliças folhosas em hidroponia exige alguns cuidados com a nutrição, podendo ocorrer maior acúmulo de nitrato nas plantas que nos demais cultivos (MIYAZAWA *et al.*, 2001; BENNINI *et al.*, 2002). Nesse cultivo, o fertilizante nitrogenado é fornecido nas formas nítrica e amoniacal, facilmente absorvidos pela raiz em quantidades muito acima da capacidade da planta assimilar, acumulando, assim, o excedente no tecido vegetal (TAKAHASHI *et al.*, 2007). O nitrato consumido em excesso pode ser prejudicial à saúde, podendo levar à formação de nitrito e causar inibição do transporte de oxigênio no sangue e quando combinados com aminas presentes no organismo, formam as nitrosaminas, substâncias cancerígenas, mutagênicas e teratogênicas. (FINE *et al.*, 1977; CRADDOCK, 1983; SANTAMARTA & LAZARO 1998; BENNINI *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2007). Entretanto, o monitoramento dessas substâncias é essencial para garantir a qualidade dos alimentos. De acordo com a FAO, o índice de máxima ingestão diária admissível (IDA), de nitrato é de 5 mg/kg de peso vivo e, 0,2 mg/kg, para o nitrito. Sendo assim, o consumo de alface cultivadas no sistema hidropônico deve ser cauteloso, pois pode trazer riscos à saúde humana (MIYAZAWA *et al.*, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2007).

2.2.2 Cultivo Convencional

Em geral, o cultivo convencional é a prática da agricultura fundamentada em um “pacote tecnológico” imposto pela Revolução Verde.

Esse pacote é sustentado basicamente por seis práticas básicas: cultivo intensivo do solo, monocultura, irrigação, aplicação de fertilizantes sintéticos altamente solúveis, controle químico de pragas, doenças e ervas daninhas, bem como manipulação genética de plantas cultivadas (BONILLA, 1992; CERVEIRA, 2002).

O sistema de cultivo convencional tem como objetivo elevada produção, deixando de lado a preocupação com a conservação do meio ambiente. Logo esta prática traz consigo graves conseqüências como a degradação do solo, desperdício e uso exagerado de água, poluição ambiental, perda da diversidade genética, perda do controle sobre a produção agrícola, desigualdade social, entre outros (CERVEIRA, 2002).

Esta prática deixa a desejar na qualidade nutricional e biológica dos alimentos, os quais são carentes em determinadas vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais, além de acarretar problemas de saúde tanto para os agricultores quanto para os consumidores (NEVES *et al.*, 2004).

O relatório da ANVISA (2001) diz que: "o uso de agrotóxicos no processo de produção agrícola e a conseqüente contaminação dos alimentos, têm sido alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública, gerando a necessidade de realização da avaliação toxicológica e do estabelecimento de parâmetros de segurança relativos à sua utilização, bem como de programas e ações de controle, cientificamente embasados e tecnicamente aplicáveis. A exposição de pessoas aos agrotóxicos pode ser atribuída tanto ao consumo de alimentos oriundos da produção agropecuária onde estes são usados, quanto ao contato direto, no caso dos aplicadores rurais e/ou manipuladores, ou ainda ao contato indireto, como no caso das populações que estão sujeitas à aplicação de agrotóxicos para controle de vetores das endemias".

2.2.3 Cultivo Orgânico

A agricultura Orgânica, que engloba vários conceitos ou termos (ecológico, biodinâmico, natural, sustentável, regenerativo, biológico, agroecológico e permacultura), é definida de várias maneiras, devido à

diversidade de seus sistemas de produções, estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (ORMONDE *et al*, 2002).

Segundo Altieri (2002), a agricultura orgânica pode ser definida como um sistema de produção que exclui fertilizantes e pesticidas sintéticos, procurando substituir insumos adquiridos externamente por aqueles encontrados nas propriedades, ou próximos a elas. Já para Caporal & Costabeber (2004), agricultura orgânica são aplicações técnicas e métodos diferenciados dos pacotes convencionais impostos pela Revolução Verde, os quais normalmente se estabelecem de acordo e em função de regras que orientam a produção, e impondo limites ao uso de certos tipos de insumos e a liberdade para o uso de outros.

Desta forma, no Brasil, a agricultura orgânica é definida pela lei nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): ‘considera-se como sistema orgânico de produção agropecuária como todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso de recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase da cadeia de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção ao meio ambiente”.

De acordo com Paschoal (1994), a agricultura orgânica visa estabelecimentos de sistemas agrícolas ecologicamente equilibrados e estáveis, economicamente produtivos, de elevada eficiência quanto à utilização dos recursos naturais, resultando em alimentos saudáveis e livres de resíduos tóxicos, produzindo em harmonia com a natureza e com as necessidades reais da população.

Apesar dos diferentes conceitos e definições de agricultura orgânica propostos por seus idealizadores, estão tornando-se cada vez mais distante,

pois na prática esse sistema nada mais é que uma produção a qual se encontra de em acordo com a lei regulamentada por um organismo competente, a certificadora (ORMONDE *et al.*, 2002).

2.3 Certificação

O mercado consumidor de alimentos vem se tornando cada vez mais exigente em termos de alimentos seguros, logo em todo o mundo estão sendo adotadas normas técnicas para a produção, industrialização e comércio de alimentos orgânicos. Estas são estabelecidas por associações responsáveis pela certificação (PASCHOAL, 1994).

Segundo Penteado (2007), o processo de certificação é o enquadramento da propriedade às normas estabelecidas, a qual tem como meta a preservação do meio ambiente, a segurança alimentar e as relações sociais justas. Esta surgiu da necessidade de identificar a procedência de um alimento, tendo como objetivo permitir ao agricultor um produto diferenciado e garantir ao consumidor um produto isento de contaminantes químicos, biológicos e físicos, respeitando o meio ambiente e o trabalhador. Ainda segundo esse autor, atualmente, a agricultura convencional também é passível de certificação. A propriedade certificada tem de obedecer a recomendações técnicas cumprindo boas práticas agrícolas.

Segundo estudos realizados por Ormond *et al.* (2002), o Brasil possui 19 certificadoras, sendo 12 nacionais e sete estrangeiras. As principais certificadoras brasileiras encontram-se no estado de São Paulo, sendo elas a Associação de Agricultura Orgânica (AAO) e o Instituto Biodinâmico (IBD) (PEÑA, 1996). Até o momento o IBD é a única certificadora brasileira reconhecida pelo International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), órgão responsável por definir regras que credencia um determinado produto orgânico para exportação (IFOAM, 2001; REZENDE & FARINA, 2001).

Apesar da importância da certificação, esta apenas indica a origem geográfica, o tipo de processamento, ou a empresa processadora do alimento, muitas vezes não realizando análises biológicas para verificação do nível de

contaminação por microrganismos, sendo este pedido somente no ato de abertura do estabelecimento, através do laudo da vigilância sanitária (RESENDE & FARINA, 2001), logo não garantindo totalmente a segurança do alimento.

2.4 Segurança Alimentar

No Brasil, o conceito de segurança alimentar é definido pela garantia, a todos, de condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais e ainda, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo, assim, para uma existência digna em um contexto de desenvolvimento integral da pessoa humana (CONSEA, 2004; PANEGASSI, 2005).

Spers & Kassouf (1996) definem a segurança alimentar como aquisição pelo consumidor de alimentos de boa qualidade, livres de contaminantes de natureza química (insumos), biológica (microrganismos), física (vidros, pedras), ou qualquer substância que possa acarretar problemas à saúde pública.

Ao contrário do que se imagina, existe o risco de contaminações dos alimentos orgânicos por produtos químicos utilizados no cultivo convencional, isto se dá em função da deriva e de poluentes persistentes no meio ambiente. Além deste fato, existe um ponto bastante questionado pelos movimentos contrários a agricultura orgânica, que é a contaminação microbiológica causada pelo uso intensivo de dejetos animais no sistema orgânico (DAROLT, 2003). Logo não pode deixar de lembrar que o cultivo convencional também utiliza dejetos animais para a adubação.

Até o momento, não é possível ao consumidor verificar se há um controle da presença de microrganismos nos alimentos, logo é recomendável que o sistema agroindustrial, seja ele orgânico ou convencional, tome iniciativa de eliminar esses pontos de riscos, os quais comprometem a segurança do alimento, pois a incerteza sobre a sanidade e seriedade no gerenciamento da

cadeia de produção e comercialização pode levar a um atraso no desenvolvimento destes mercados (REZENDE & FARINA, 2001).

2.5 Fontes de contaminação microbiológica no campo

2.5.1 Insumos Naturais

Insumos naturais são substâncias de origem animal e vegetal que fornecem nutrientes imprescindíveis que promovem a adubação do solo e a nutrição das plantas ou mesmo para complementar a adubação mineral. A eficiência na fertilidade e desempenho do cultivo dos insumos naturais dependem do grau de eficiência na decomposição dos resíduos, podendo ter efeito imediato no solo, ou efeito residual, por meio de um processo mais lento de decomposição e disponibilidade de nutrientes às plantas na medida de sua necessidade, proporcionando assim maiores condições de resistir às agressões (CHABOUSSOU, 1987; PRIMAVESI, 1990; GLIESSMAN, 2001). Porém cuidados no manejo desses resíduos são indispensáveis para que a produção de alimentos não seja prejudicada. Os principais cuidados a serem considerados, são: a sanidade dos adubos orgânicos e a aplicação em quantidades adequadas (DANIEL, 2005).

Para manter a sanidade dos insumos naturais, evitando assim a contaminação do alimento por microrganismos patogênicos de origem fecal é exigido pelas certificadoras, medidas controladoras, como a compostagem, que inativa os microrganismos patogênicos antes dos insumos serem aplicados ao solo (TAM & TIQUIA, 1994; WU & MA, 2001). A certificação orgânica assegura que o insumo é compostado em temperatura bastante elevada durante 100 a 120 dias, tempo esse necessário para eliminar a maioria dos patógenos (SEDIYAMA *et al.*, 2008).

Devido a utilização de insumos naturais, como o esterco proveniente de animais, a agricultura orgânica tem sido alvo da polêmica de que seus alimentos tornam-se mais suscetíveis à contaminação, entretanto, diversos estudos vêm sendo realizados, mas não há informações suficientes disponíveis que provem que o cultivo orgânico difere do convencional no que

se diz respeito à contaminação por microrganismos patogênicos (FRANZ *et al*, 2007). Conseqüentemente a isso, torna-se de grande importância a aquisição de métodos redutores de riscos de contaminação microbiológica, ou ainda, de procedência orgânica aprovado pela certificadora.

2.5.2 Hábitos inadequados de higiene

Outra importante fonte de contaminação de alimentos, no campo, é o trabalhador que está envolvido no cultivo dos produtos agrícolas. O grau de higiene pessoal do agricultor pode exercer uma forte influência na transmissão de bactérias patogênicas, visto que essas pessoas têm contato direto com o alimento durante toda a etapa de produção e principalmente durante a colheita (BRACKETT, 1999; SOARES & CANTOS, 2005).

Estudos realizados em Araraquara, SP, demonstraram a ocorrência de práticas não adequadas de higiene adotadas pelos horticultores, como lavagem das hortaliças, com a finalidade de remover a terra das raízes, na própria água de irrigação ou em tanques com água acumulada de várias lavagens, levando conseqüentemente a um alto grau de contaminação fecal (BONILHA, 1992).

Guilherme *et al.* (1999), investigou a prevalência de enteroparasitas em fezes e depósitos subgúeaes de horticultores da região de Maringá, no Paraná, e constatou que 26% apresentaram um ou mais parasitas em suas fezes e apenas 6% apresentaram enteroparasitas em depósitos subgúeaes. Estas análises foram essenciais na comprovação da possível contaminação fecal desses produtos pelos horticultores, evidenciando as baixas condições higiênicas existentes entre os produtores da região.

Sabendo que os trabalhadores agrícolas podem ter um impacto importante na segurança sanitária dos produtos que eles cultivam, é então de extrema importância que os mesmos adotem procedimentos sanitários formais. No entanto muitos desses trabalhadores se recusam a empregar práticas higiênicas simples, como lavar as mãos após utilização de sanitários públicos (BRACKETT, 1999), tornando indispensável à realização de ações educativas sobre os preceitos básicos de higiene pessoal, visando sensibilizar essas

peças em relação aos problemas acarretados aos consumidores pelos produtos provenientes de práticas inadequadas. Devido a esses fatos os programas governamentais não podem deixar de considerar a segurança alimentar como componentes estratégicos de conscientização coletiva, traçando diretrizes básicas para os diversos campos de atuação e cenários, no sentido de valorizar a qualidade de vida da população (SOARES & CANTOS, 2005).

2.5.3 Água de Irrigação

Além dos fatores de contaminações já citados, temos que levar em consideração a contaminação por água de irrigação, sendo esta considerada como destaques em pesquisas sobre contaminações.

O homem utiliza a água para diversas atividades, logo a escassez desse recurso é um fator limitante à sobrevivência e ao desenvolvimento econômico e social de uma região (ISAAC-MÁRQUEZ, *et al.*, 1994).

A agricultura é reconhecidamente a atividade humana que mais consome água, em média 70% de todo o volume captado, destacando-se a irrigação como atividade de maior demanda (ALVES *et al.*, 2007). Em áreas de clima seco, a irrigação é responsável pelo consumo de 50 a 85% dos recursos hídricos disponíveis (CAPRA & SCICOLONE, 1998). No Brasil, a agricultura utiliza 61% de todo o volume captado e geralmente, a água utilizada na irrigação é proveniente de rios, córregos, lagos ou poços adjacentes às hortas, sendo raramente encontrada a utilização de água de abastecimento público devido, principalmente, ao seu alto custo, uma vez que a demanda exigida para este propósito é bastante elevada. Portanto, a água destinada à irrigação é transportada através de bombas ou canais desde o rio e riacho até as hortas, sem qualquer tratamento prévio (OLIVEIRA & GERMANO 1992).

Segundo Leon & Cavallini (1999), as descargas de esgotos domésticos e industriais nos rios, lagos e oceanos da América Latina são de 40 milhões de metros cúbicos por dia, sendo que, apenas 10% recebe tratamento prévio. Além da disposição inadequada de esgotos domésticos, ha a

deficiência de saneamento básico em alguns lugares, contribuindo efetivamente para a contaminação dos corpos hídricos receptores, inclusive lençóis freáticos (BRANCO, 1983; TAKAYANAGUI *et al.*, 2001). Essa situação torna-se ainda mais crítica devido a uma grande parte dos efluentes não tratados é utilizada para fins agrícolas.

No Brasil, registros do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram que 80% das internações hospitalares são devida a doenças de veiculação hídrica (MERTEN & MINELLA, 2002). Essa situação é ocasionada pela poluição de agentes biológicos lançados ou que desenvolvem nos corpos de água, geralmente patogênicos, destacando-se o grupo de bactérias coliformes, que são indicadores de poluição por excrementos caracterizados como coliformes termotolerantes (FRANCO *et al.*, 2006).

A avaliação da qualidade da água de irrigação torna-se muito importante, pois esta é considerada um dos principais veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa (OMS, 1989). As doenças de veiculação hídrica são transmitidas pela rota oral fecal, através da ingestão de água ou até mesmo alimentos contaminados por microrganismos e enteroparasitas (AMARAL, *et al.*, 2003).

Segundo Fayer *et al.* (2000), o risco de contaminação de água de irrigação em meio rural é alto devido ao fato desta estar próxima de fontes de contaminação como pastagens ocupadas por animais, deposição de resíduos orgânico animal no solo e até mesmo pelo escoamento superficial durante o período de chuva, o qual é responsável pelo transporte de dejetos indesejáveis para fontes de água local.

Em seus estudos Guimarães *et al.* (2003) constataram a presença de coliformes termotolerantes em todas as 81 amostras de água retiradas de 44 propriedades rurais na cidade de Lavras-MG. No nordeste do Estado da São Paulo foram retiradas amostras de água de 30 propriedades, 90% apresentava níveis de coliformes termotolerantes acima do permitido pelas normas definidas pela portaria 1469 de 29/12/2000- Ministério da Saúde, capítulo IV -padrão de potabilidade (AMARAL *et al.*, 2003). Estas normas definem que água para consumo humano deve ser livre de *Escherichia coli* ou coliformes

termotolerantes com ausência em 100mL ou positividade de até 5% para coliformes totais. Análises bacteriológicas demonstraram que a água de irrigação de cinco propriedades, localizadas em Maringá-PR, estava contaminada por dejetos fecais. Posteriormente foi evidenciado que estas propriedades tiveram suas hortaliças contaminadas devido à utilização desta água rica em enteropatógenos (GUILHERME, 1999). Além disso, outros estudos também têm identificado verduras com alto grau de contaminação por coliformes termotolerantes transmitidos pela água de irrigação (GUIMARÃES *et al.*, 2003). Em Lavras-MG, as análises microbiológicas realizadas identificaram que quase a totalidade dos mananciais investigados apresentava contaminação por coliformes termotolerantes (ROCHA *et al.*, 2002). Também foi constatada a presença acentuada desse grupo de bactérias nas águas de poços de duas regiões do Rio de Janeiro (FREITAS *et al.*, 2001).

No meio rural, o risco de ocorrência de surtos de doenças veiculadas pela água é bastante alto, principalmente em função da possibilidade de contaminação bacteriana de águas que muitas vezes são captadas em poços, inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais (SKUTEL *et al.*, 1990).

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

2.6 Microrganismos Indicadores

Microrganismos indicadores têm sido utilizados para verificar a contaminação de corpos d'água e alimentos por resíduos humanos

(VASCONCELOS *et al.*, 2006). Dentro os vários gêneros e espécies de microrganismos, os coliformes termotolerantes passaram a ser denominados indicadores da presença de microrganismos patogênicos por aparecerem em grande quantidade nas fezes humanas e de animais de sangue quente (OMS, 1995). O grupo de coliformes termotolerantes inclui três espécies, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* sendo a mais representativa como contaminação fecal a *Escherichia* por ser a única a apresentar origem fecal (SILVA, *et al.* 2001).

Microrganismos indicadores são empregados para avaliar a qualidade do produto final e indicar condições sanitárias inadequadas durante o processo de produção ou armazenamento (SANTANA *et al.*, 2003). Estes microrganismos são de grupos ou espécies que quando se encontram presentes em alimentos, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, uma vez que são encontrados no conteúdo intestinal do homem e animais homeotérmicos (FRANCO *et al.*, 2005).

Segundo Doyle, Beuchat, & Montville (1997) e Cunha (2006), para definição de microrganismos indicadores devem ser considerados critérios como: (I) a detecção deve ser rápida e fácil; (II) deve ser facilmente distinguível de outros microrganismos da microbiota do alimento; (III) não deve estar presente como contaminante natural do alimento, pois assim sua detecção não indicará, necessariamente, a presença de matéria fecal ou dos patógenos; (IV) deve estar sempre presente quando o patógeno associado estiver; (V) seu número deve correlacionar -se com o do patógeno; (VI) deve apresentar necessidades de crescimento e velocidade de crescimento semelhantes as do patógeno; (VII) deve ter velocidade de morte que seja ao menos semelhante à do patógeno e, se possível, sobrevivência, levemente superior à do patógeno; (VIII) deve estar ausente nos alimentos que estão livres do patógeno, ou estar presente em quantidades mínimas; (IX) ter como habitat exclusivo o trato intestinal do homem e outros animais; (X) deveria ocorrer em número muito alto nas fezes; (XI) deveria apresentar alta resistência ao ambiente extra-enteral; (XII) deveria haver técnicas rápidas, simples e precisas para a sua detecção e/ou contagem.

Como exemplo de microrganismos indicadores podem ser citados aqueles que segundo a ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) podem ser agrupados em:

- 1) Microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilas, contagem de *psicrotróficos* e *termófilos*, contagem de bolores e leveduras.
- 2) Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Enterococcus*, *Enterobactériaceae* e *Escherichia coli* (SILVA, 2001).

2.6.1 Coliformes totais

Coliformes totais são bacilos gram-negativos, da família Enterobacteriaceae, não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos, capazes de fermentar lactose com produção de gás a 35-37° C, por 48 horas (CUNHA, 2006). Distribuídos amplamente na natureza, esse microrganismos são encontrados no solo, água, plantas e no trato intestinal de seres humanos e animais (MARTINS, 2006).

O grupo de coliformes totais é composto por bactérias dos seguintes gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como hábitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos, os demais, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como na vegetação e no solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos. (FRANCO 2005; CUNHA, 2006). Portanto, a contagem de coliformes termotolerantes fornece informações, mais seguras, sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da presença de enteropatógenos.

2.6.1.1 Coliformes Termotolerantes

Coliformes termotolerantes são constituídos por um sub-grupo de bactérias pertencentes ao grupo de coliformes totais, as quais apresentam a capacidade de fermentar lactose com produção de gás a 44-45° C em 48 horas (SILVA *et al.*, 2001).

O grupo de Coliformes termotolerantes é composto por três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo apenas o primeiro de origem fecal, estando presente no trato gastrintestinal do homem e animais de sangue quente. Devido a este fato, pesquisa de coliformes termotolerantes em alimentos é menos eficiente do que a pesquisa direta de *E. coli* (SILVA, *et al.*, 2001).

2.6.1.2 *Escherichia coli*

Em 1985, Theodore Escherich descreveu um microrganismo encontrado em grande quantidade nas fezes humanas o qual foi por ele nomeado *Bacterium coli*. No início do século passado, este microrganismo passou a ser utilizado como indicador de qualidade sanitária e na década de 50 foi chamado pelos microbiologistas de *Escherichia coli* tornando-se modelo para diversos estudos na biologia e medicina (KUHNER *et al.*, 2000). Este microrganismo pertence à família *Enterobacteriaceae*, e como já foi dito, encontra-se no grupo dos coliformes termotolerantes. O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris* sendo espécie *E. coli* é considerada como destaque (KURNERT *et al.*, 2000; RIBEIRO, 2006).

Cerca de 95% dos coliformes existentes em fezes humanas e de animais de sangue quente são *E. coli*. Embora também possa ser introduzida a partir de fontes não fecais, é considerada como o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento, pois satisfaz todas as exigências de um indicador ideal. Por esse motivo, as tendências atuais se direcionam no sentido da detecção específica de *E. coli*, com o

desenvolvimento de diversos métodos que permitem a enumeração rápida dessa espécie diretamente (SILVA *et al.*, 2001).

Em conseqüência, a freqüente precariedade das condições higiênico-sanitárias de produção de alimentos, é comum neles observar contaminação de *E. coli*, a qual se dá principalmente por contato com material fecal ou contatos com superfícies contaminadas (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000).

A presença de *E. coli* em alimentos pode ter dois significados:

1) Por ser uma bactéria entérica, indica contaminação de origem fecal, apontando condições higiênicas insatisfatórias.

2) Diversas linhagens de *E. coli* são patogênicas, e não podem estar presentes nos alimentos.

Todo o alimento colocado à venda deveria estar em condições seguras para o consumo, independente do tipo de manejo, seja ele orgânico ou convencional, uma vez que qualquer tipo de alimento encontra-se exposto a contaminações microbiológicas desde o momento de sua produção até o seu consumo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de Cultura

3.1.1 Água Peptonada (H₂O_p)

Composição

Peptona.....0,225 g

Água Destilada.....225 mL

Preparação

A peptona teve sua massa determinada em uma balança analítica de precisão e foi colocada em um erlenmeyer de 500 mL, junto com a água destilada. Com a completa dissolução e conseqüente homogenização dos componentes, o erlenmeyer contendo o meio de cultura foi esterilizado em autoclave sob condições de 121 °C por 20 min. Também foram distribuídos volumes de 9 ml do mesmo meio em tubos de ensaio, para a realização de diluições seriadas.

3.1.2 Caldo Lauretil Sulfato Triptose (LST)

O caldo LST foi preparado conforme as especificações do fabricante. Este meio foi esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos. Volumes de 9 ml foram distribuídos em tubos de ensaio contendo em seu interior tubos de Durham. Este meio foi utilizado para a detecção presuntiva de coliformes.

3.1.3. Caldo *E. coli* (EC)

O caldo EC foi preparada seguindo as especificações do fabricante. Após dissolvidos os ingredientes, 9 ml foram distribuídos em tubos de ensaio contendo em seu interior tubos de Durhan. Este meio foi esterilizado em autoclave a 121° C a 20 min. Este meio foi utilizado para contagem de coliformes termotolerantes sendo a confirmação do resultado presuntivo.

3.1.4 Ágar Eosina de Metileno (EMB)

O meio BEM foi preparado conforme especificações do fabricante. Com a completa dissolução e conseqüente homogeneização dos componentes, o erlenmeyer contendo o meio de cultura foi esterelizada em autoclave sob condições de 121 °C por 20 min. Após o ciclo completo de esterilização e um curto período de resfriamento, este foi distribuído em placas de petri esterilizadas dentro de um fluxo laminar. Este meio foi utilizado para detecção presuntiva de *E. coli*.

3.1.5 Meio Ágar Nutriente (NA)

Este meio de cultura foi preparado segundo as instruções do fabricante e autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Após o ciclo completo de esterilização e um curto período de resfriamento, este foi distribuído em placas de petri esterilizadas dentro de um fluxo laminar. O meio NA foi utilizado nos plaqueamentos das linhagens de *E. coli* isolada no meio EMB.

3.1.6 Ágar Citrato de Simons

Este meio de cultura foi preparado segundo as instruções do fabricante, colocado em tubos de ensaio com tampa, e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos. Após o ciclo completo de esterilização os tubos foram resfriados em forma de rampa. O meio foi utilizado para a prova bioquímica, teste de citrato.

3.1.7 Caldo Triptona 1%

Este caldo foi preparado conforme as especificações do fabricante e colocados em tubos de ensaio com tampa e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos. O meio foi utilizado para prova bioquímica, teste de Indol.

3.1.8 Caldo VM e VP

O caldo VM VP foi preparado conforme as instruções do fabricante, colocados em tubos de ensaio com tampa e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos. O meio foi utilizado para s prova bioquímica, teste de vermelho de Metila e Voges-Proskauer.

3.2 Propriedades Seleccionadas e Locais da Pesquisa

Foram avaliadas dez propriedades seleccionadas de diferentes municípios do estado de São Paulo, que foram identificadas pelos códigos: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10. Destas propriedades, cinco foram de cultivo orgânico (CO) e cinco de cultivo convencional (CC), como mostra a Tabela 1

Tabela 1. Dados de identificação das dez propriedades seleccionadas, no período de junho a dezembro de 2007.

Propriedades	Locais	Cultivos *
P1	Ibiúna	CO
P2	Ibiúna	CO
P3	Jaguariúna	CO
P4	Jaguariúna	CO
P5	Morungaba	CO
P6	Ibiúna	CC
P7	Ibiúna	CC
P8	Campinas	CC
P9	Campinas	CC
P10	Morungaba	CC

*(CO) cultivo orgânico (CC) Cultivo convencional

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, durante o período de junho a dezembro de 2007.

3.3 Coletas de materiais para análise

Amostras de alface crespa, água de pré-lavagem (AL) e de irrigação (AI) de dois tipos de cultivos, CC e CO foram coletadas nas propriedades selecionadas conforme Tabela 1.

3.3.1 Água de Irrigação e Pré-lavagem

As coletas das amostras de água foram realizadas em dois períodos, de junho a agosto e de outubro a dezembro de 2007. Tanto a AL quanto a AI foram coletadas em frascos de vidro de 250 ml esterilizados previamente. Duas amostras foram coletadas nas fontes de água de irrigação (poços, lagoas, riachos) e mais duas nas fontes de água de pré-lavagem (poços, lagoas, riachos, saneamento básico). Os frascos com água foram embalados em sacos plásticos de polipropileno previamente esterilizados e armazenados em caixas térmicas contendo gelo. O tempo decorrido entre a coleta e o início das análises foi de duas horas.

3.3.2 Alface

As coletas das amostras de alface foram realizadas em dois períodos, de junho a agosto, época 1(E1), e de outubro a dezembro, época 2 (E2) de 2007. Em cada propriedade, foram coletadas 12 amostras de alface de maneira aleatória, sendo que seis delas passaram pelo processo habitual de pré-lavagem e as seis restantes permaneceram da mesma forma que foram retiradas do canteiro. Não foram levados em consideração os pesos e os tamanhos das amostras. Durante a coleta, as alfaces foram embaladas uma a uma em sacos de polipropileno previamente esterilizados, devidamente fechados e etiquetados. Também, o material coletado foi transportado para o laboratório em caixas térmicas contendo gelo e o tempo decorrido entre a coleta e o início das análises não ultrapassou de duas horas.

3.4 Análises Microbiológicas

3.4.1 Análise microbiológica da água

Para análise de coliformes termotolerantes (CT) e *Escherichia coli* (EC) em água, frascos contendo AI e AL, foram devidamente etiquetados e levados até o laboratório, em caixas térmicas. Para análise o frasco foi desinfestado com álcool 70% e levados até uma câmara de fluxo laminar. Posteriormente foi realizado o teste presuntivo de coliformes, onde cinco porções de 10 ml da amostra de água foram transferidas para tubos contendo 10 ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Anexo 1.2) com tubo de Duhan invertido. Os tubos com LST foram incubados a 35° C por 24h e observados quanto à produção de gás. Em caso positivo (crescimento e produção de gás) foi realizado o teste confirmativo para CT. Em caso negativo os tubos foram reincubados até completar 48h e repetiu-se a leitura passando para teste confirmativo nos casos em que houve crescimento com produção de gás (SILVA *et al.* 2007).

3.4.2 Análise microbiológica da alface

Para análise de CT e EC em alface, foram retiradas as folhas deterioradas das amostras de alface e, em seguida, pesadas assepticamente 25g de cada amostra em um béquer; estas foram homogeneizadas a 225 ml de água peptonada 0,1%, com um Mixer desinfestado com hipoclorito de sódio e álcool 70%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . Através desta diluição obtiveram-se as diluições 10^{-2} e 10^{-3} , também em água peptonada 0,1% (Anexo 1.1). Com uma pipeta foram adicionadas porções de 1mL das respectivas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} em uma série de três tubos contendo 6mL do Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durhan invertido. Os tubos foram incubados em BOD a 35° C por 24 horas. Em caso de não crescimento, ausência da produção de gás observada no tubo de Durhan, os tubos foram reincubados até completar 48 horas. Em caso de crescimento, produção de gás observada no tubo de Durhan, passou-se para o item subsequente. A não ocorrência de gás após 48 horas de incubação indicou a ausência de coliformes nos 25g da amostra (SILVA *et al.* 2007).

3.4.3 Teste confirmativo para coliformes termotolerantes

A partir de cada tubo positivo de LST, foi transferida uma alçada da cultura para tubos contendo 6ml de caldo *E. coli* (EC) (Anexo 1.3) com tubos de Durham invertidos . Posteriormente os tubos foram incubados em BOD a $\pm 45,5^{\circ}$ C por 24 horas e observou-se o crescimento com a produção de gás no tubo de Durham. A incubação dos tubos de EC foi sempre acompanhada de um tubo inoculado com uma cepa padrão de EC e de outro inoculado com uma linhagem padrão de *Enterobacter aerogenes*. Nas condições da incubação apenas a cepa de EC produz gás. Qualquer alteração na temperatura pode ser evidenciada pelo comportamento das linhagens padrão. Em caso de crescimento (produção de gás observada no tubo de Durham), foram anotados os números de tubos e determinados o Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes em uma tabela de NMP apropriada às diluições. Os tubos foram incubados em BOD a 35° C por 24 horas. Em caso de não crescimento, ausência da produção de gás observada no tubo de Durham, os tubos foram reincubados até completar 48 horas. Em caso de crescimento, produção de gás observada no tubo de Durham, passou-se para o item subsequente. (SILVA *et al.* 2007).

3.4.4 Teste confirmativo e serie bioquímica para *Escherichia coli*

A partir de cada tubo positivo de EC com a produção de gás, uma alçada do conteúdo foi estriada em meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)(Anexo 1.4). As placas foram incubadas em BOD a 35° C durante 24 horas. Após observar o crescimento de colônias típicas no meio, nucleadas com centro preto (Anexo Fig12.F), com ou sem brilho metálico, duas colônias foram transferidas para meio Ágar Nutriente (NA) (Anexo1.5) e incubadas em BOD a 35° C por +24 horas. A partir de culturas puras em NA foram realizadas a coloração de Gram e as provas bioquímicas (Teste de citrato, Teste de indol, Teste vermelho de metila (VM) e teste de Voges-Proskauer (VP)) (SILVA *et al.* 2007).

3.4.4.1 Coloração de Gram

Em uma lamina de vidro foi preparado um esfregaço o qual passou pelas seguintes etapas: 1) cobertura com solução cristal de violeta por um minuto; 2) cobertura com lugol por um minuto lavado, 4) lavagem com álcool, 5) lavagem com água; 6) cobertura com safranina por 15 segundos 7) lavagem com água. Após a secagem do material, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico em objetiva com óleo de imersão (SILVA *et al.* 2007)..

3.4.4.2 Teste de Citrato

Foi inoculada uma alçada da cultura na rampa do Meio Agar Citrato de Simmons (Anexo 1.6). Os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas. A viragem alcalina, com alteração da cor do meio verde para azul indicou resultado positivo, já a não alteração da cor do meio indicou resultado negativo. Cepas de EC são citrato-negativas (SILVA *et al.* 2007)..

3.4.4.3 Teste de Indol

Foi inoculada uma alçada da cultura em meio Caldo Triptona 1% (Anexo 1.7). Os tubos foram incubados a 35° C por 24 horas. Após este período, foram adicionadas cinco gotas de reagente de Kovacs em cada tubo. O desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura indicou resultado positivo, já o desenvolvimento de um anel de cor amarela (a mesma cor do meio) indicaram resultados negativos. As cepas de EC podem ser indol positivas ou negativas (SILVA *et al.* 2007)..

3.4.4.4 Teste de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer (Vm-VP)

Foi inoculada uma alçada com o inoculo em tubos contendo o meio VM-VP (Anexo 1.8), os quais foram incubados a 35° C por 48 horas. Para a realização do teste VP foram transferidos assepticamente 1 ml da cultura para

um tubo de ensaio e adicionado 0,6 ml de solução de α -naftol 5%. Em seguida foram adicionados 0,2ml de solução KOH 40% e após sofrer agitação foi adicionada uma leve pitada de cristais de creatina para aceleração da reação. Após uma hora de descanso, o material foi observado e o desenvolvimento da cor vermelha ou rósea no meio de cultura indicou o resultado positivo, já a permanência do meio na cor do reagente (amarelada) indicou resultado negativo. Para a realização do teste VM os tubos contendo cultura remanescente do caldo VM-VP foram reincubadas por mais 48 horas adicionais. Após o período de incubação, foram adicionados a 2,5ml da cultura 5 gotas de solução Vermelho de Metila e de imediato foi observado a mudança de coloração do meio para vermelho (resultado positivo) ou amarelo (negativo). As cepas de EC são VP negativas e VM positivas (SILVA *et al.* 2007).

3.5 Avaliação das condições ecológicas das propriedades

Paralelamente a pesquisa, foi realizado um levantamento das práticas agrícolas e das condições ambientais das propriedades pesquisadas, a fim de detectar prováveis riscos de contaminação. Com o auxílio de um questionário (Anexo 2) foram entrevistados um trabalhador ou um funcionário de cada horta para a obtenção de informações que compreendam dados de identificação da horta e dos fatores de risco, como as condições ecológicas de cada propriedade investigada.

3.5 Identificações das bactérias isoladas pela técnica de tubos múltiplos para *Escherichia coli* através da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular, MIDI.

Os isolados foram inoculados em meio TSBA®BBL, pelos métodos das estrias cruzadas, e incubados a $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$, por (24 ± 2) h. Decorrido este tempo, foram coletadas 40 mg (4 a 6 alças com capacidade de 10 μL) do terceiro quadrante da placa e transferidas para tubos Kimax (100 x 13 mm). Adicionou-se, então, 1 mL do reagente de saponificação, agitou-se durante 10

segundos. Os tubos foram colocados em banho-Maria (95-100)°C, por 5 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados em água e novamente agitados por 10 segundos, retornando ao banho-Maria, por mais 25 minutos. Após resfriamento em água, adicionou-se 2 mL do reagente de metilação. Os tubos foram agitados 10 segundos e colocados em banho (80±1)°C, por 10 minutos; seguido por resfriamento em água. Adicionou-se 1,25 mL do reagente de extração e foram colocados os tubos no rotator clínico (FISHER M346) por 10 minutos. Com o auxílio de pipetas Pasteur, foi descartada a fase inferior (aquosa) e adicionado ao tubo 3 mL do reagente de lavagem básica, retornando os tubos para o rotator clínico por mais 5 minutos. Ao fim deste tempo, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm (3 min), quando 2/3 da fase superior (0,5 mL) foi transferido para os *vials* (2 mL).

Utilizou-se o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector *Flame Ionization Detector* (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface foi obtida pelos programas *ChemStation* A0901[1206] e *Sherlock* 4.0. O método e a biblioteca selecionados foi o TSBA40.

O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contêm comprimento e área de picos, área nomeada, e tempo de retenção. O resultado final é apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando, dessa forma, o microrganismo em questão.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta metodologia foi utilizada para identificação quantitativa de bactérias pertencentes a folhas de alface de diferentes cultivos (CO e CC) e tratamentos (L e NL).

3.61 Fixação

As folhas de alface foram cortadas em pequenos discos com o uso de um furador e estes foram colocados em eppendorfs contendo uma solução de

2,5% de Glutaraldeído, 2,5% de paraformaldeído em tampão cacodilato pH7 (0,05M) com CaCl_2 (Karnovsky modificado) (KITAJIMA & LEITE, 1999). A solução foi descartada, em seguida foi colocado tampão cacodilato 0,05M três vezes. Em seguida foi feita uma pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4) por 1 hora.

3.6.2 Desidratação, secagem ou ponto crítico e metalização

O tetróxido de ósmio foi descartado e as amostras foram lavadas com água destilada, sendo submetidas a soluções crescentes de acetona (30, 50, 70 e 90%) por 10 min., em seguida uma solução de acetona 100% foi colocada nas amostras por 3 vezes. Para eliminar a umidade nas amostras, as mesmas foram submetidas ao aparelho de secagem ao ponto crítico, onde se substitui a acetona pelo gás carbônico, o qual é eliminado pela elevação da temperatura. (BRAY, 1993). As amostras foram metalizadas (metalizador Emitech) com ouro e em seguida, visualizadas ao microscópio eletrônico “field emission” de varredura de varredura Gemini Leo 982 Leica Zeiss do laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

3.7 Análise dos resultados

A análise dos resultados tanto para água quanto para o produto alface foi realizada através da técnica de Número Mais Provável (NMP), a qual permitiu estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra sob análise.

4. Resultados e Discussão

4.1 Avaliação Microbiológica

4.1.1. Avaliação Microbiológica da Água

As Figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam os resultados de determinação do nível médio de contaminação por coliformes termotolerantes (CT) e *Escherichia coli* (EC) e seus intervalos de confiança 95% em água de irrigação (AI) e pré-lavagem (AL), oriundas das propriedades P1 a P10 nos cultivos orgânicos (CO) e convencionais (CC), respectivamente.

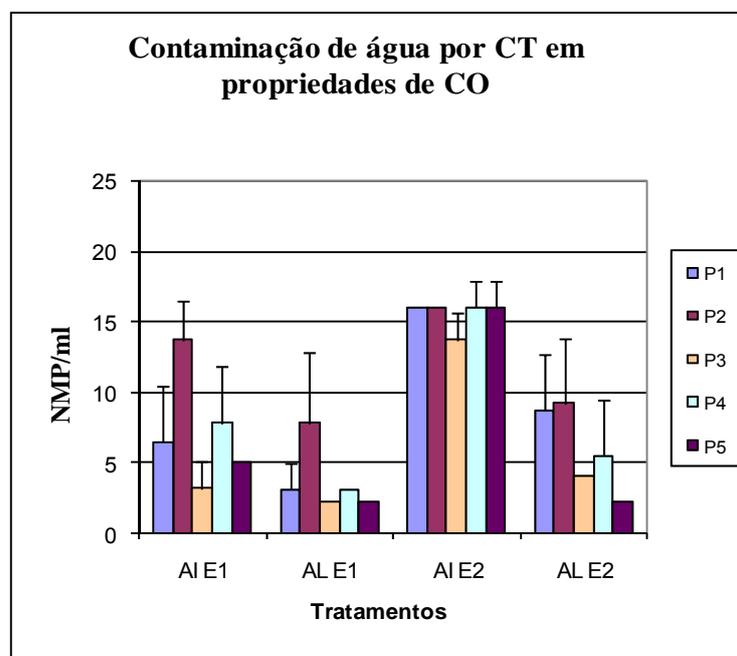


Figura 1. Concentração de CT em NMP/ml e seus intervalos de confiança 95%, em AI e AL nas E1 e E2 em sistema de CO.

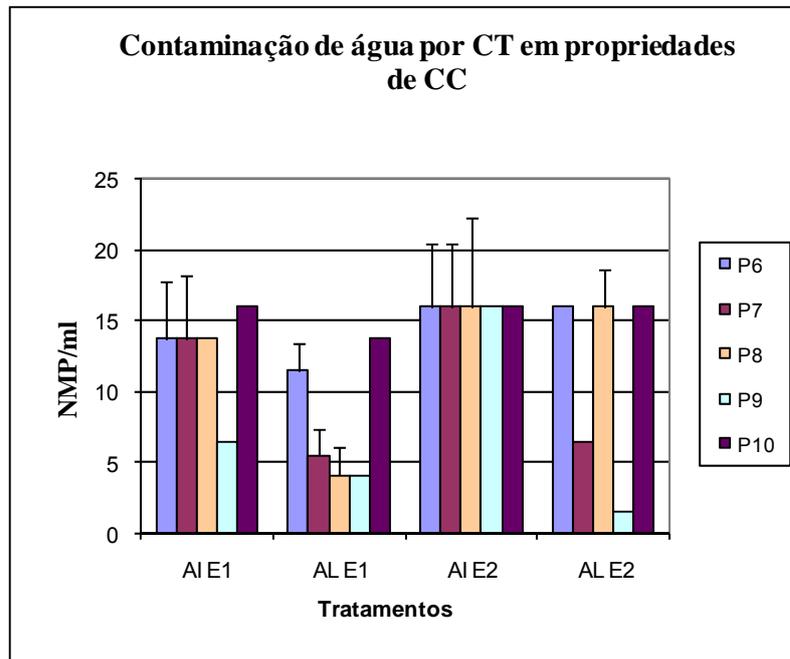


Figura 2. Concentração de CT em NMP/g e seus intervalos de confiança 95%, em AL e AI nas E1 e E2 em sistemas de CC.

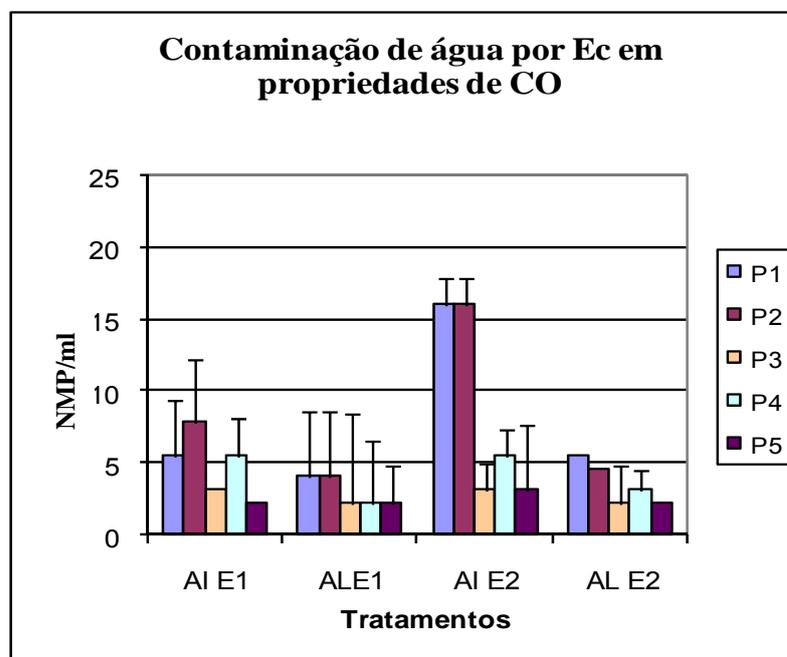


Figura 3. Concentração de EC em NMP/g e seus intervalos de confiança 95%, em AL e AI nas E1 e E2 em sistema de CO.

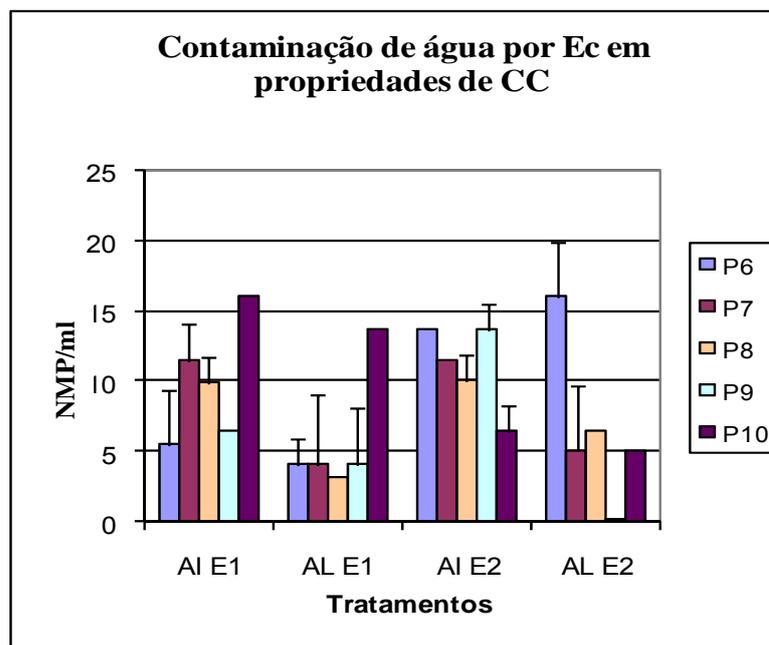


Figura 4. Concentração de EC em NMP/g e seus intervalos de confiança 95%, em AL e AI nas E1 e E2 em CC.

Os índices médios de contaminação da AI por CT, mostrados nas Fig. 1 e 2, variam de: 3,17 a 13,73 na E1 e de 13,73 a 16 NMP/ml na E2 no CO (Fig. 1) e de 6,47 a 16 na E1 e 16 NMP/ml na E2 do CC (Fig. 2). Já para AL, a variação desses índices foi de 2,2 a 7,83 na E1 e 2,2 a 9,2 NMP/ml na E2 do CO (Fig. 1) e de 4,13 a 13,73 na E1 e 0,2 a 16 na E2 NMP/ml do CC (Fig. 2). Enquanto isso, os índices médios de contaminação da AI para EC (Figuras 3 e 4) mostram variação de 2,2 a 7,83 na E1 e 3,16 a 16 NMP/ml na E2 do CO (Fig. 3) e de 5,5 a 16 na E1 e 6,47 a 13,73 NMP/ml na E2 do CC (Fig. 4), ao passo que no caso da AL, a variação foi de 2,2 a 4,87 na E1 e 2,2 a 5,5 NMP/ml na E2 do CO (Fig. 3) e de 3,16 a 13,73 na E1 e 1,53 a 16 NMP/ml na E2 do CC (Fig. 4).

Os resultados indicam que, a exceção para EC na E2 na AI, os índices médios de contaminação de CT (Fig. 1 e 2) e de EC (Fig. 3 e 4), tanto na AI como na AL, foram maiores nas propriedades do CC em relação às do CO em ambas as épocas de avaliação. Provavelmente este fato se deve a falta de monitoramento tanto na água de irrigação quanto na água de lavagem das propriedades de CC, ao contrario do que ocorre em CO onde as certificadoras

exigem o análises de qualidade destas águas. Pode-se levar em conta também a presença de animais próximos aos leitos de água, os quais foram muitas vezes observados em propriedades de CC.

Quando comparadas as épocas, pode-se observar que a E2(grandes precipitações) tanto para AI quanto para AL apresentaram níveis de contaminação superiores aos da época 1(seca).

Segundo Shehane et al. (2005), o número de bactérias de origem fecal aumenta significativamente nos recursos hídricos nas épocas de grandes precipitações, estando mais uma vez de acordo com os resultados da pesquisa em questão. Isto ocorre devido ao fato da água da chuva transportar para os recursos hídricos, fontes de contaminação e grandes quantidades de matéria orgânica, oriundas tanto das cidades quanto dos campos. A temperatura pode ser relacionada a este fato, pois em Tampa Bay (EUA) durante invernos fortes com grandes precipitações, o número de bactérias de origem fecal aumentou significativamente quando comparados a invernos com baixa precipitação (LIPP *et al.*, 2001).

De acordo com a Resolução da CONAMA nº 20, de 10 de junho de 1986, águas doces destinadas à irrigação de hortaliças consumidas cruas não deverão exceder o limite de 2 bactérias/ml (tanto para CT quanto para EC). Tomando-se como base os valores apresentados, apenas duas amostras encontram-se abaixo do valor estabelecido para CT e EC, sendo ambos do tratamento AI da P9 na E2 (Fig. 2 e 3) tanto para CT quanto para EC, enquanto que os demais apresentaram NMP de CT e EC superior ao valor estabelecido pela resolução (CONAMA, 1986). Segundo Guilherme et al., (1999); Franco et al., (2007) e Biscaro et al., (2008), ao analisarem água de irrigação em propriedades das cidades de Maringá, Curitiba e Botucatu respectivamente, constataram que 100% das amostras de AI analisadas apresentaram contaminação por CT acima estabelecido pela legislação do CONAMA. Freitas et al. (2001), ao analisar água de poços utilizadas para irrigação no Rio de Janeiro, constatou que 50% das amostras analisadas encontravam-se níveis de contaminação por CT a cima do estabelecido. Souto (2005),na Paraíba, também constatou em amostras analisadas, níveis de contaminação por CT e

EC acima do estabelecido, que variam de $7,75 \times 10^3$ a $1,53 \times 10^6$ NMP/ml, respectivamente. Já para Barros et al. (1999), os resultados variaram de 2 a $1,3 \times 10^5$ na E1 e 4 a $6,2 \times 10^6$ NMP/ml na E2 para cultivo convencional na Paraíba. Em Campinas, Thiney (2001), obteve resultados semelhantes à presente pesquisa para AI que variaram de 4 a 49 NMP/ml para CT e de 4 a 23 NMP/ml para EC. Entretanto, foram constatados na cidade de Ribeirão Preto por Takayanagui et al. (2001), que apenas 2 de 26 propriedades apresentaram AI com contaminação por CT (54 e 17 NMP/ml). Embora escasso, um estudo realizado por Falavigna et al., (2005) no Paraná, constataram níveis de CT em AL acima do estabelecido pelo CONAMA, assim como, em outro estudo, Takayanagui et al., (2007) verificaram que 22% das amostras de AI e 33% da AL encontraram-se acima do padrão estabelecido pela legislação.

4.1.2. Análise Microbiológica da Alface

A Tabela 2 apresenta resultados da concentração média e o seu intervalo de confiança 95% de coliformes termotolerantes (CT) em alfaces lavada (L) e não lavada (NL) colhidas nas épocas E1 e E2 em cultivo orgânico (CO) e convencional (CC).

Tabela 2. Índices médios de coliformes termotolerantes (CT) e o seu Intervalo de confiança (IC) 95% em alface não lavada (NL) e pré-lavada (L) em NMP/g, coletadas nas épocas 1 (E1) e 2 (E2) sob cultivo orgânico (CO) e convencional. (CC)

	Coliformes termotolerantes (CT) NMP/g							
	Alface Não Lavada (NL)				Alface Pré-Lavada (L)			
	E1 ⁽³⁾	IC 95%	E2 ⁽⁴⁾	IC 95%	E1 ⁽³⁾	IC 95%	E2 ⁽⁴⁾	IC 95%
P1⁽¹⁾	36	16	509	383	21	8	63	39
P2⁽¹⁾	543	355	417	278	50	20	77	57
P3⁽¹⁾	14	7	11	10	5	3	7	4
P4⁽¹⁾	58	30	162	135	41	31	58	72
P5⁽¹⁾	40	44	103	79	7	4	27	29
P6⁽²⁾	457	267	61	41	266	337	51	43
P7⁽²⁾	325	122	312	337	130	82	25	10
P8⁽²⁾	442	277	293	343	63	40	89	60
P9⁽²⁾	34	18	42	21,6	19	12	16	9
P10⁽²⁾	40	28	159	144	236	343	45	26

(1) Propriedades orgânicas; (2) Propriedades convencionais (3) Época 1 (4) Época 2

Conforme a Tabela 2, os índices médios de CT, no CO variaram de 14 a 543 NMP/g para alfaces NL na E1 e 11 a 509 NMP/g para alface NL na E2 e de 5 a 50 NMP/g para alface L na E1 e 7 a 77 NMP/g para alface L na E2, enquanto que o CC apresentou índices de contaminação por CT variando de

34 a 457 NMP/g para alface NL na E1 e 42 a 312 NMP/g para alface NL na E2 e de 19 a 266 NMP/g para alface L na E1 e 16 a 89 NMP/g para alface L na E2. Os resultados mostram que nos dois sistemas de cultivo, o tratamento NL apresentou índices médios de contaminação superiores em relação ao L, independente das épocas de colheita (E1 e E2). Embora CO tenha apresentado o maior índice de contaminação encontrado na pesquisa (543 NMP/g), foi constatado que, o CC apresentou índices médios totais superiores quando comparado ao CO, no tratamento NL, na E1, enquanto na E2, o CO apresentou índices médios totais superiores ao CC. Por outro lado, para o tratamento L, foi constatado maior índice de contaminação no CC em relação ao CO na E1, destacando-se a P6 (266 NMP/g), P7 (130 NMP/g) e P10 (236 NMP/g), logo na E2 os resultados médios totais foram bastante equilibrados e uniformes nos dois cultivos.

Tabela 3. Porcentagem de propriedades com níveis de CT acima do estabelecido pela ANVISA (100NMP/g)

	Porcentagem de propriedades com níveis de CT acima do estabelecido pela ANVISA			
	Alface Não Lavada (NL)		Alface Pré-Lavada (L)	
	Época1	Época2	Época1	Época2
Cultivo Orgânico	20%	80%	0%	0%
Cultivo Convencional	60%	60%	60%	0%

De acordo com a Resolução 12 da ANVISA (2001), o limite máximo estabelecido de contaminação por CT e EC em alface é de 100 NMP/g. Levando em consideração este dado, a porcentagem de propriedades que obteve níveis de contaminação superiores ao exigido pela ANVISA foi, para CO de 20% no tratamento L na E1 e de 80% no tratamento NL na E2 e para CC 60% no tratamento L e 60% no tratamento NL na E1 e de 60% no tratamento NL na E2 (Tab. 3).

No Brasil, pesquisas têm constatado verduras com alto índice de contaminação por CT, sendo a água utilizada na irrigação uma importante fonte de contaminação para as hortaliças (CRISTOVÃO *et al.*, 1967; BARUFALDI *et al.*, 1984; MARZOCHI, 1997; ARAUJO *et al.*, 1999; TAKAYANAGUI *et al.*, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2003; BISCARO *et al.*, 2008).

Segundo Barros et al. (1999), o nível de contaminação por CT em CC, variou de 10×10^3 a $1,6 \times 10^6$ NMP/g. Entretanto, para CO, os resultados de Souto (2005), variaram de $4,1 \times 10^4$ e $2,8 \times 10^6$ NMP/g. Além de apresentarem índices de contaminação superior ao presente trabalho, os mesmos autores mostraram que 100% das propriedades analisadas encontravam-se com níveis de contaminação por CT acima do permitido pela ANVISA. Por sua vez, em pesquisa recente, Biscaro et al. (2008), constataram que todas as amostras de alface analisadas se enquadraram abaixo do nível de contaminação máximo estabelecido pela legislação.

Como este trabalho, Takayanagui et al. (2007), analisaram o nível de contaminação por CT em alfaces L e NL, e constataram que 24% das amostras de alface NL e 16% das amostras de L não se enquadravam na legislação, enquanto que, Santana et al. (2006), ao compararem o CO com o CC verificaram que o primeiro apresentou resultados superiores de contaminação por CT.

A Tabela 4 apresenta resultados da concentração média de EC e seu intervalo de confiança, em alfaces L e NL colhidas nas E1 e E2 em propriedades de CO e CC.

Tabela 4. Índices médios de *E. coli* (EC) e o seu Intervalo de confiança (IC) 95% em alface não lavada e lavada em NMP/g, coletadas nas épocas 1 (E1) e 2 (E2) sob cultivo orgânico (CO) e convencional(CC).

	<i>Escherichia coli</i> (EC) NMP/g							
	Alface Não Lavada (NL)				Alface Pré-Lavada (L)			
	E1	IC 95%	E2	IC 95%	E1	IC 95%	E2	IC 95%
P1*	14	4	370	327	6	2	32	8
P2*	102	143	273	353	13	4	9	3
P3*	8	3	5	3	5	2	4	2
P4*	22	10	117	90	8	3	7	3
P5*	13	7	30	26	3	0,2	9	11
P6**	51	46	23	11	9	6	22	14
P7**	42	27	52	26	10	5	13	8
P8**	34	46	30	27	15	7	19	7
P9**	11	7	14	4	7	6	6	3
P10**	14	6	30	25	12	5	13	6

(*) Propriedades orgânicas; (**) Propriedades convencionais (***) Época 1 (****) Época 2

Conforme a Tabela 4, os índices médios de contaminação por EC no CO variaram de 8 a 102 NMP/g na E1 e de 5 a 370 NMP/g na E2 para alfaces NL e de 3 a 13 NMP/g na E1 e de 4 a 32 NMP/g na E2 para alfaces L, enquanto que, as variações foram para o CC de 11 a 51 NMP/g na E1 e 14 a

52 NMP/g na E2 para alfaces NL e de 7 a 15 NMP/g na E1 e de 6 a 22 NMP/g na E2 para alfaces L. Os resultados indicaram, nas duas épocas e nos dois sistemas de cultivo, que o nível de contaminação por EC foi maior no tratamento NL. Por outro lado, o CO apresentou os maiores índices de contaminação por EC, destacando-se a P2 (102 NMP/g) na E1 no tratamento NL e as P1 (370 NMP/g), P2 (273 NMP/g) e P4 (117 NMP/g) no NL na E2, quando comparado com o CC. Por outro lado, a E2 obteve os maiores índices de contaminação no tratamento NL, quando comparada com a E1 no CO. Este fato não pode ser observado no CC, pois os índices de contaminação foram mais equilibrados e uniformes, já para o tratamento L, apesar de apresentar todos os resultados dentro da Legislação da ANVISA, os maiores resultados médios foram obtidos no CC.

Estudos realizados em CC por Cristóvão et al. (1967), na cidade de São Paulo, mostraram que os índices de contaminação nas amostras de alface analisadas variaram de 30 a $1,1 \times 10^4$ NMP/g, enquanto que para Araújo (1999), esta variação foi de 27 a 87 NMP/g, em Campina Grande. No entanto, na região de Campinas, Thiney (2001), constatou uma variação de 2 a 79 NMP/g. Alves et al. (2007), verificaram em estudos realizados no Rio de Janeiro, índices de contaminação por EC, em propriedades de CO acima do permitido pela ANVISA em todas as propriedades analisadas, sendo a variação de seus resultados entre 250 a $2,5 \times 10^4$ NMP/g; entretanto, os autores não constataram diferenças significativas entre os CO e CC. Por outro lado, Biscaro et al., (2008) verificaram que todas as amostras analisadas se enquadraram na legislação em vigor, enquanto que, Baumgartner et al. (2007), constataram ausência de EC em todas as amostras de alface avaliadas. Assim como o presente trabalho, Sandri (2003) coletou suas amostras de alface NL em duas épocas diferentes, as quais foram denominadas de ciclo 1 (06-07/2001) e de ciclo 2 (08-10/2001), constatando que no ciclo 1 o nível de contaminação foi de 148 NMP/g, sendo superior aos definidos pela ANVISA, ao contrário do ciclo 2 no qual o resultado foi de 86 NMP/g, diferindo dos resultados obtidos no presente trabalho.

Microrganismos como CT e EC são denominados de indicadores, os quais são utilizados em pesquisas para a verificação da qualidade das águas e

dos alimentos e, conseqüentemente, monitoram as suas condições sanitárias (ODUMERO *et al.*, 1997).

4.2 Condições Ambientais das Propriedades

A Tabela 5 mostra as práticas agrícolas e não agrícolas utilizadas e as condições ambientais das propriedades em CO e CC.

Tabela 5. Práticas agrícolas e não agrícolas utilizadas e Condições ambientais das propriedades de CO e CC.

Práticas e Condições Ambientais	P1*	P2*	P3*	P4*	P5*	%	P6**	P7**	P8**	P9**	P10**	%
Ambientais												
AduobosQuímicos	-	-	-	-	-	0	+	+	+	+	+	100
Aduobos Orgânicos												
Cama de Frango	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	0
Bokashi	-	-	-	-	+	20	-	-	-	-	-	0
Farinha de Osso	-	+	-	+	-	40	-	-	-	-	-	0
Torta de Mamona	+	+	-	-	-	40	-	-	-	-	-	0
AduobosOrgânicosComerciais	-	-	-	-	-	0	-	+	+	-	-	40
Aduobos Autorizado	+	-	+	+	+	80	+	+	+	+	+	100
Presença de Animais												
Cão	+	+	+	+	-	80	+	+	+	-	+	80
Aves	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	100
Cavalo/ Boi/ Vaca	-	-	-	-	-	0	+	-	+	-	-	40
Suínos	-	-	-	-	-	0	-	-	+	-	-	20
Procedimentos Higiênicos												
Higiene Pessoal	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	100
Uso de Luvas	-	-	-	+	-	20	-	-	-	-	-	0
Pré-lavagem Hipoclorito	-	-	-	-	+	20	-	-	-	-	-	0
Certificação	+	+	+	+	+	100	+	-	-	-	-	20
Água de Irrigação												
Córrego	+	-	-	-	-	20	+	+	-	-	-	40
Poço	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0
Lagoa	-	+	+	+	+	80	-	-	+	+	+	60
Água Encanada	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0
Água de Pré-Lavagem												
Corrego	-	-	-	-	-	0	+	-	-	-	-	20
Poço	+	+	+	-	+	80	-	+	-	+	-	40
Lagoa	-	-	-	-	-	0	-	-	+	-	+	40
Água Encanada	-	-	-	+	-	20	-	-	-	-	-	0

(+) presença e (-) ausência. (*) Cultivo Orgânico. (**) Cultivo Convencional

Apesar desses resultados, todas as propriedades apresentaram a prática de higiene pessoal básica (lavar as mãos), mas em apenas 20% delas (CO), a colheita é feita com utilização de luvas e o procedimento de pré-lavagem da alface é realizado com solução de hipoclorito de sódio (Tabela 5).

Além disso, no CO todas as propriedades possuem certificação, enquanto que no CC, apesar de raro, a P6 também apresentou certificação considerando a exigência das grandes redes de supermercado. Verifica-se ainda que em 100% dos casos analisados, as águas de irrigação da hortaliças não recebe nenhum tratamento prévio e são provenientes de córregos e represas. Entretanto, em relação a água de pré lavagem, apenas P4 possui tratamento (água de abastecimento municipal), pois as propriedades restantes utilizam água de poços não tratados (80% CO e 40% CC), córregos (20% CC) e lagoas (40% CC).

Os fatores da Tabela 5 podem justificar os resultados das avaliações microbiológicas referidos nas Tabela 2 e 4, pois através desse fatores pode ser feita uma comparação do o alto índice de contaminação em alfaces NL (E1 e E2) com a percentagem de AI que apresentaram tratamento prévio (0%), sendo estas provenientes de córregos e lagoas. Como já foi mencionado, em época de altas precipitações o número de bactérias de origem fecal aumentam, pois grandes volumes de matéria orgânica e materiais contaminados são levados até os recursos hídricos expostos (córregos e lagoas), através da água da chuva, justificando assim o aumento do número de CT e EC constatados nas análises de água (Fig. 1, 2, 3 e 4) e alface (Tab. 2 e 4) na E2. Além disso, o fato do CO apresentar maior contaminação por EC pode estar relacionado com a utilização de adubos orgânicos produzidos na propriedade que apresentaram dejetos de origem fecal e a presença de animais nas proximidades dos locais de produção. A falta de procedimentos higiênicos assim como a contaminação da água de pré lavagem, também podem contribuir para a contaminação das alfaces colhidas e embaladas.

Ao aplicar questionários em diversas propriedades, Souto (2005), relata que a presença de altos índices de contaminantes já mencionado anteriormente tem como fator decisivo a presença de animais nas proximidades da horta em 100% das propriedades, além da constatação do não tratamento prévio da AI.

Segundo Silva et al. (2007), a contaminação alimentar pode ocorrer em diversas fases da cadeia de produção do alimento. No campo, a

contaminação pode ocorrer através do solo com material de origem fecal (adubos não tratados), do uso da AI imprópria e do esterco sem compostagem (ELEMENTO 2006, ALVES *et al.*, 2007). Na colheita, a contaminação pode ocorrer com o manuseio em condições higienico-sanitárias precárias, pelo acesso de animais nas proximidades das hortas e na área de manipulação ou por contaminação da embalagem e caixas. A contaminação também pode se dar no transporte se as hortaliças não forem protegidas (lona ou baú) e nas atividades de carga e descarga quando há falhas nos cuidados higiênicos (TAUXE *et al.*, 1997; SANTANA *et al.*, 2006).

4.3 Identificação dos isolados pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular MIDI.

A Tabela abaixo (Tabela 6) mostra identificação de bactérias isoladas de alface lavada (L) e não lavada (NL) e água de irrigação (AI) e lavagem (AL) através de análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular MIDI.

Tabela 6. Identificação, de bactérias isoladas de alface pré-lavada (L) e não lavada (NL); água de irrigação (AI) e lavagem (AL) através da análise de perfil de ácidos graxos.

Isolados	Matriz de Isolamento	Identificação de microrganismos	MIDI (IS) ⁽¹⁾
M6G1AI	AI ⁽²⁾	<i>Escherichia fergusonii</i>	0,839
M6G2AL	AL ⁽³⁾	<i>Escherichia fergusonii</i>	0,864
M72AI	AI ⁽²⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,807
M82AL	AL ⁽³⁾	<i>Escherichia fergusonii</i>	0,837
M102AL	AL ⁽³⁾	<i>Escherichia fergusonii</i>	0,699
M111L	L ⁽⁴⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,703
M211N	NL ⁽⁵⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,836
M2121L	L ⁽⁴⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,866
M2222N	NL ⁽⁵⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,741
M2232L	L ⁽⁴⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,919
M2311N	NL ⁽⁵⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,889
M3212L	L ⁽⁴⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,893
M5121L	L ⁽⁴⁾	<i>Escherichia coli</i>	0,670
M6112N	NL ⁽⁵⁾	<i>Escherichia fergusonii</i>	0,840
M10232N	NL ⁽⁵⁾	<i>Escherichia Fergusonii</i>	0,883

⁽¹⁾Índice de Similaridade. (2) Água de irrigação; (3) Água de pré- lavagem; (4) Alface pré- lavado (5) Alface Não lavado

De todas as linhagens isoladas de neste trabalho, 20 foram selecionadas aleatoriamente para serem identificadas a partir da análise do

perfil de ácidos graxos da membrana celular MIDI. Através deste sistema de identificação, pôde-se observar que quinze isolados foram identificados, sendo os cinco restantes invalidados devido aos seus baixos índices de similaridade (abaixo de 0,600).

A análise dos isolados constatou a presença de duas diferentes espécies, sendo elas: *Escherichia coli* e *Escherichia fergusonii*.

Relatos mostram que *E. fergusonii* é considerada como um patógeno oportunista que possui uma alta resistência a antibióticos e encontra-se associado a infecções humanas como: diarreias, infecção pleural, infecção do trato urinário (ITU), bacteremia e infecções em feridas (MAHAPATRA *et al.*, 2005).

Isolada em 1985 por Farmer *et al.*, (1985) a espécie despertou o interesse de estudo em outros autores e passou a ser isolada de locais como, o conteúdo intestinal de animais de sangue quente e do homem (FRENEY *et al.*, 1987; FUNKE *et al.*, 1993; MAHAPATRA, 2005), alimentos manipulados (REGNAULT *et al.*, 2000; FEGAN *et al.*, 2006), sangue, urina, pus e água (REGNAULT *et al.*, 2000).

Segundo Farmer *et al.*, (1985); Savini *et al.*, (2008) apesar de pertencerem a espécies diferentes, a *E. coli* e a *E. fergusonii*, encontram-se estreitamente relacionadas tanto em suas características moleculares quanto bioquímicas. Ambas possuem seqüências de aminoácidos 96% iguais e fermentam lactose com produção de gás, são Gram negativas, Indol positivas, Citrato negativas, VM positivas e VP negativas.

Em estudos realizados por Regnault *et al.*, (2000) foi utilizada a técnica de tubos múltiplos para isolamento de *E. coli* em alimentos e água; logo ao utilizarem as técnicas moleculares a fim de confirmar as amostras de *E. coli* isoladas, verificaram também que além de *E. coli* haviam isolado *E. fergusonii* e *Shigella* sp. Entretanto, apesar da técnica de tubos múltiplos ser vastamente utilizada para detecção de *E. coli*, esta técnica não é 100% confiável, pois não isola apenas *E. coli*, podendo também isolar bactérias bem próximas de sua filogenia.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A figura 5 ilustra a colonização da superfície foliar de alface em cultivo convencional (CC) do tratamento de alface pré lavada (L).

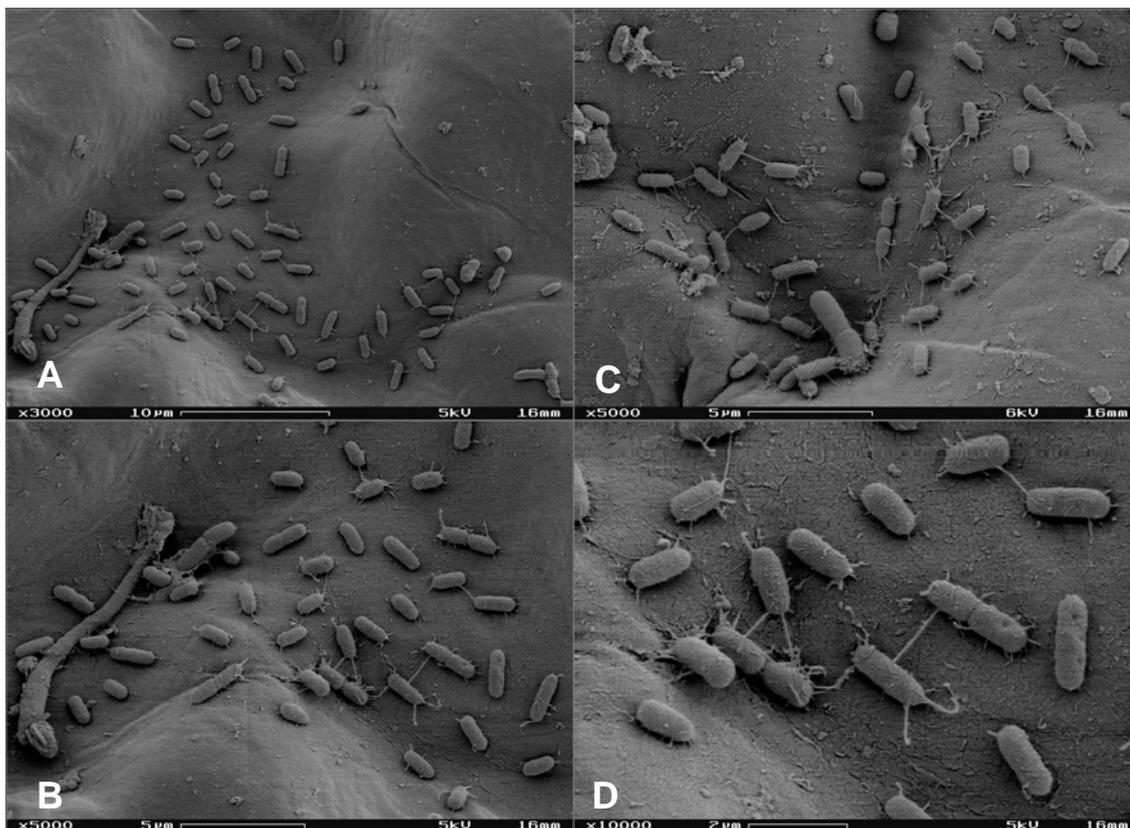


Figura 5. Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alface L pertencente ao CC. A) Bacilos distribuídos na vilosidade da folha. B) Bacilos na forma isolada e diplobacilos. C) Bacilos na forma isolada e diplobacilos. D) Bacilos na forma isolada e diplobacilos.

A visualização da figura 5 mostra, de forma clara, que apenas bactérias de forma bacilar são encontradas na superfície foliar do tratamento lavado, estando elas arranjadas em diplobacilos e também em forma isolada (TORTORA *et al.*, 2002). Todas as bactérias detectadas na superfície foliar deste tratamento se encontram próximas uma da outra, dispostas nas vilosidades contidas na folha. Nenhuma outra forma de bactéria pôde ser observada.

A figura 6 mostra a colonização da superfície foliar de alface em CC do tratamento não lavado (NL).

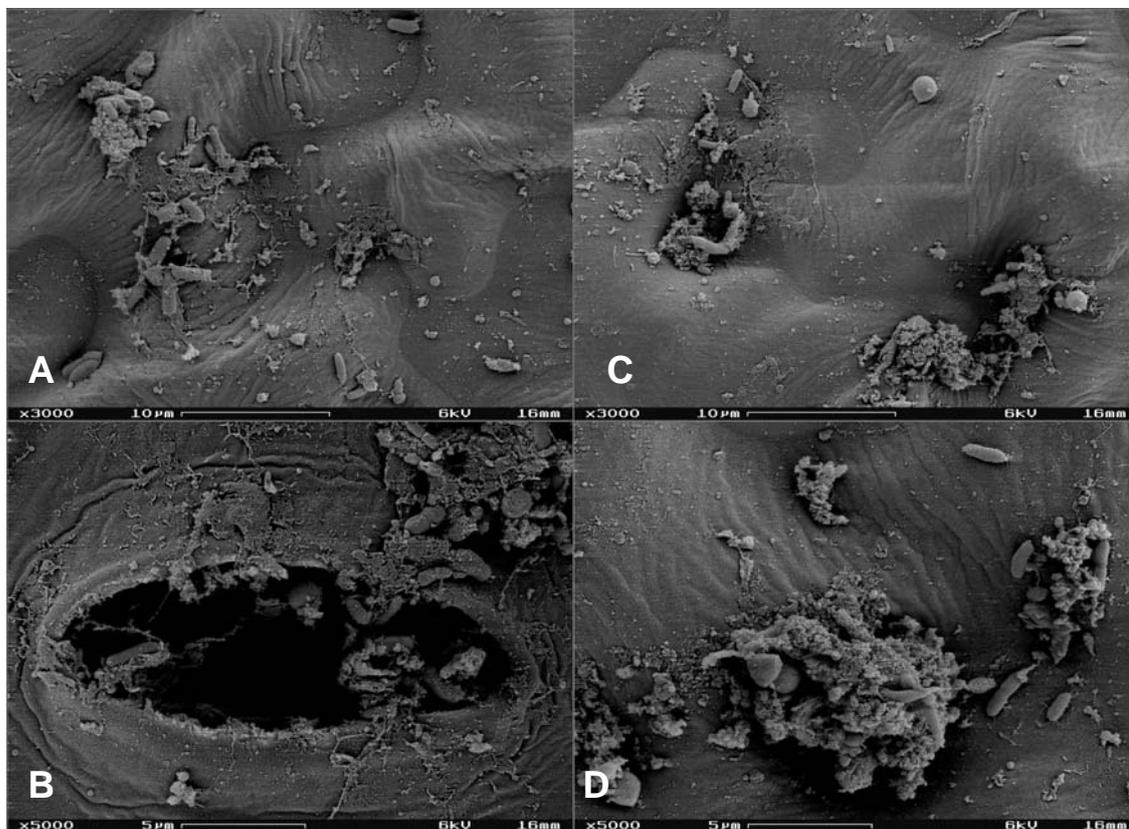


Figura 6. Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alface NL pertencente ao CC. A) Bacilos e aglomerados não identificados. B) Bacilos e aglomerados não identificados colonizando o estômato da folha C) Bacilos, cocos e aglomerados não identificados. D) Bacilos cocos e aglomerados não identificados.

Na figura 6, foram encontradas duas formas de bactérias, bacilar e cocos (PELCZAR *et al.*, 1997; TORTORA *et al.*, 2002), ambas estando na forma isoladas. Além disso, foram visualizados aglomerados de substâncias os quais não puderam ser identificados. Estes são classificados como resíduos aderidos à superfície, nos quais podem estar contidos bactérias, partículas provenientes do solo e até mesmo precipitados do ar. Entretanto, estes resíduos aparentes nas elétron-micrografias, atrapalham a visualização da colonização da superfície foliar NL por bactérias.

A figura 7 ilustra a colonização da superfície foliar de alface em cultivo orgânico (CO) do tratamento L.

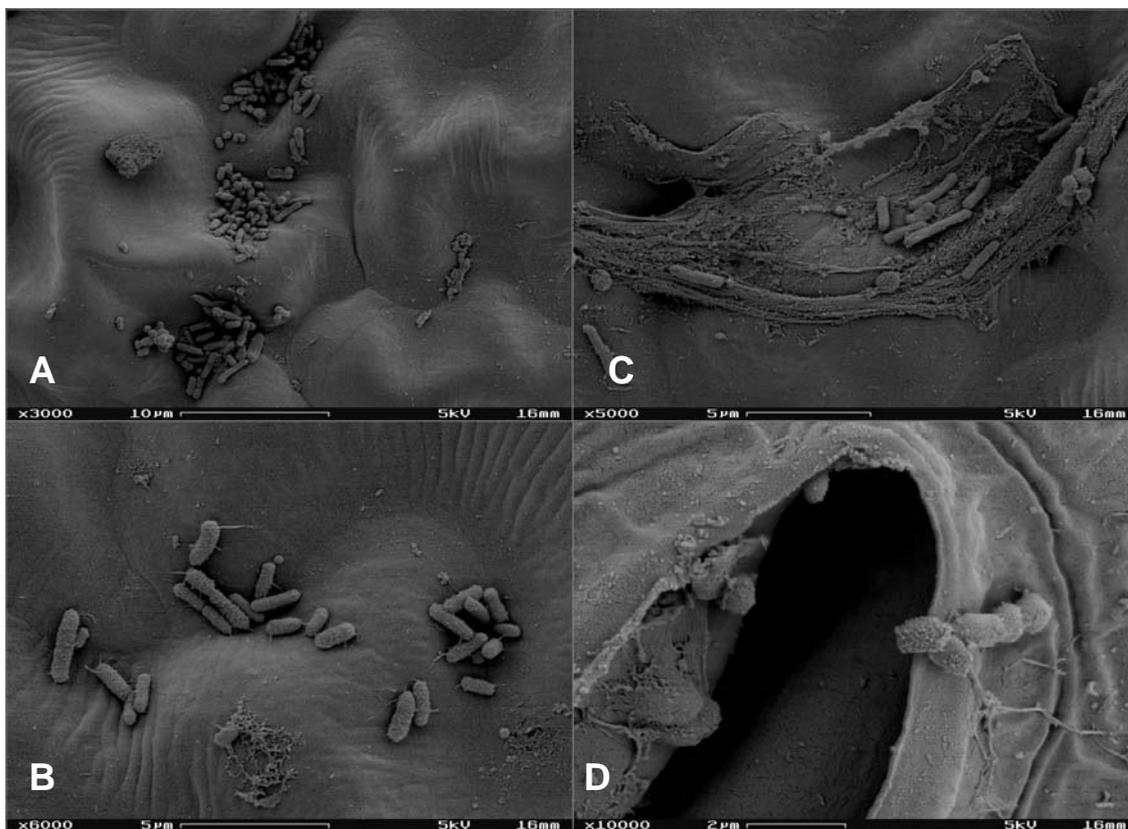


Figura 7. Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alfaca L pertencente ao CO A) Bacilos isolados distribuídos na vilosidade da folha B) Bacilos e diplobacilos distribuídos na vilosidade da folha C) Bacilos isolados e aglomerados não identificados. D) Bacilos agrupados em cadeia colonizando o estômato da folha.

Nas elétron-micrografias da figura 7, pode ser observado claramente a presença de bacilos isolados e diplobacilos, os quais se encontram na maioria das vezes distribuídos nas vilosidades da folha. Foram também visualizados bacilos agrupados em cadeia (PELCZAR *et al.*, 1997) colonizando o estomato da folha de alfaca. Diferentemente do CC no tratamento L, foram encontrados aglomerados de substancias não identificados em pequenas quantidades, onde algumas bactérias encontram-se aderidas.

A figura 8 ilustra a colonização da superfície foliar de alfaca em CO, do tratamento NL.

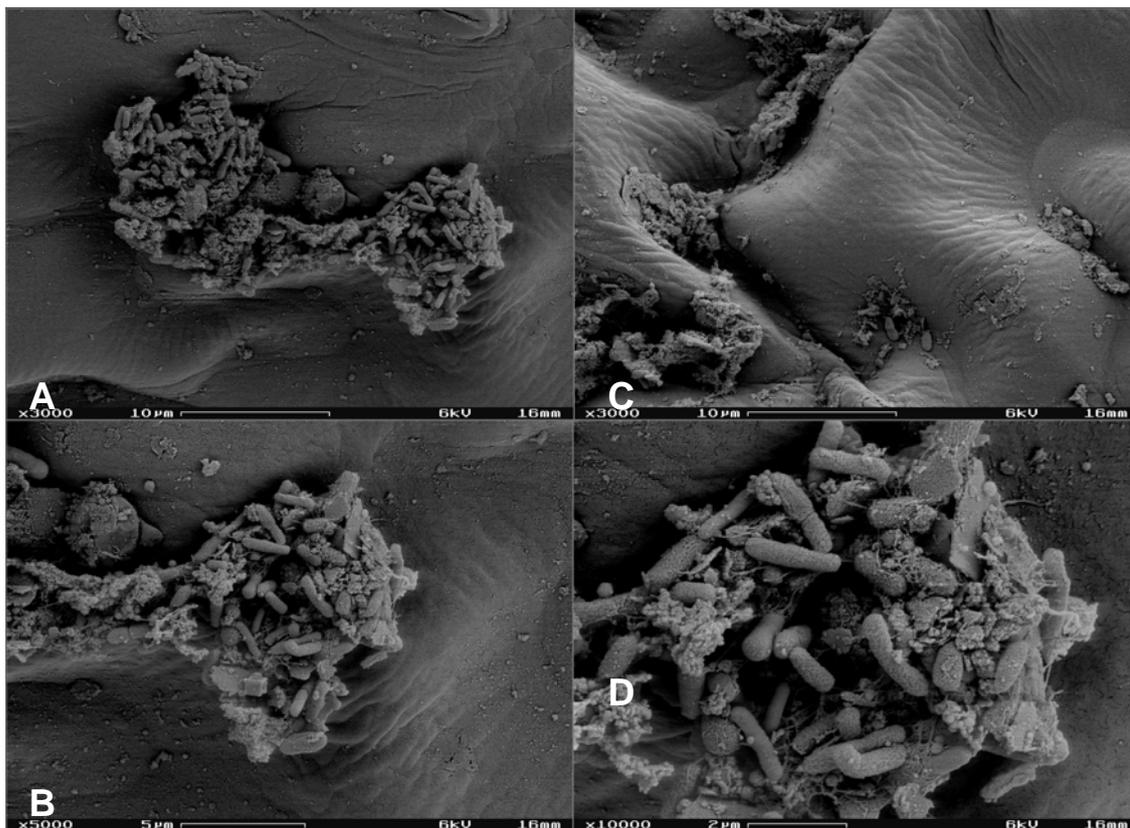


Figura 8 . Elétron-micrografias de varredura da superfície foliar de alface NL pertencente ao CO. A) Bacilos e aglomerados não identificados. B) Bacilos, cocos e aglomerados não identificados. C) Aglomerados não identificados. D) Bacilos, diplobacilos, cocos e aglomerados não identificados.

As elétron-micrografias da figura 8 não encontram-se claras, devido a presença de uma grande quantidade de aglomerados não identificados em todas as figuras. Apesar disto, pode ser observado a presença de bacilos isolados e diplobacilos (PELCZAR, 1997; TORTORA *et al.*, 2002).

Quando comparadas todas as quatro figuras, não pode ser realizada uma análise quantitativa das bactérias observadas, devido a presença de aglomerados não identificados que não deixam claro se a quantidade de bactéria difere visualmente nos tratamentos. Quando comparados os tratamentos, foi observado que o tratamento NL apresentou uma quantidade de resíduos aderidos à superfícies superior que no tratamento L tanto no CC quanto no CO. Logo este fato mostra que a lavagem das hortaliças antes de sua comercialização é de grande importância, pois como podemos observar

nas elétrón-micrografias, este ato elimina os inúmeros resíduos aderidos a folha.

Ao observar as formas de bactérias presentes nas elétrón-micrografias, foram detectados grandes quantidades de bacilos e poucos cocos em todos os tratamentos e tipos de cultivo. Em todas as micrografias foi possível identificar apenas bactérias colonizando a superfície foliar. Pesquisas mostram que a maioria dos microrganismos que habitam a superfície foliar são bactérias, muitas vezes sendo encontrado em média 10^6 a 10^7 cells/cm₂ (HIRANO & UPER, 1989; BEATTIE & LINDOW, 1995; ANDREWS & HARIS, 2000; LINDOW & BRAND 2003). Entretanto, bactérias habitantes da fitosfera tem de ter a capacidade de sobreviver as flutuações extremas, pois a superfície foliar é freqüentemente seca e a temperatura pode chegar a 40-55 ° C sob luz solar intensa. Já durante a noite, as folhas são freqüentemente molhadas com orvalho e as temperaturas caem podendo chegar a 5-10 ° C (HIRANO & UPER, 1989; YANG, *et al.*, 2001; LINDOW & BRAND, 2003). Estudos revelam que bactérias Gram-negativas possuem a capacidade de sobreviver e multiplicar-se nas superfícies foliares, independentemente das condições físicas, muitas vezes sendo responsável por doenças de origem alimentar, estando presentes em frutas e legumes frescos (COOK *et al.*, 1998; HEDBERG *et al.*, 1999; MOHLE *et al.*, 1999; CAMPBELE *et al.*, 2001; LINDOW & BRAND 2003; YANG *et al.*, 2004). Ercolani (1976); Islan *et al.* (2004) e Brande & Amundson (2008), ao analisarem alface durante todo seu período vegetativo, desde a semente até a colheita, constataram a presença de EC e a sua multiplicação em todos os períodos, sobrevivendo assim as flutuações extremas ocorridas na superfície foliar. Embora vários estudos tenham relatado a presença de EC na fitosfera em situações extremas, o potencial deste patógeno em colonizar folhas intactas de alface na fase de pré e pós-colheita permanece largamente desconhecido (LI *et al.*, 2001; MANDRELL *et al.*, 2006; DELAQUIS *et al.*, 2007; BRANDE & AMUNDSON, 2008). Enfim, essas características deixam evidentes os resultados adquiridos neste estudo, onde a presença de EC foi constatada na superfície foliar de alface tanto em épocas de baixas quanto de altas

temperaturas (Tab. 3) havendo diferenciação significativa apenas quando comparados os sistemas de cultivos e os tratamentos realizados.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser auferidas:

1- A água de irrigação apresentou um alto índice de contaminação por coliformes termotolerantes e *E.coli* sendo considerada como um dos principais fatores responsáveis pela contaminação da alface, independente do sistema de cultivo.

2- Propriedades de cultivo convencional apresentaram maiores índices de contaminação por coliformes termotolerantes e *E.coli* em água de irrigação e água de pré-lavagem quando comparadas com propriedades de cultivo orgânico, devido a falta de controle da qualidade e de proteção dos corpos d'água e a presença de animais.

3- A Pré-lavagem da alface contribuiu para a redução da contaminação por coliformes termotolerantes e *E.coli* no produto.

4- Ambos os cultivos apresentaram altos índices de contaminação por coliformes termotolerantes em alface não lavada, com ênfase, no cultivo convencional.

5- Na água não tratada, a presença de animais no campo, a utilização de adubos não autorizados e o cultivo inadequado da alface são fatores de risco que contribuíram para a contaminação da alface produzida em sistemas orgânicos e convencionais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução n. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, União de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144>>. Acesso em: maio de 2008.

ALTIERI, M. **Agroecologia**: bases científicas para uma agricultura sustentável. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2002. 592 p.

ALVES, S. L. da C.; NEVES, M. C. P.; COSTA, J. R. **Avaliação da contaminação microbiológica de alface orgânica e convencional em diferentes pontos de comercialização**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 105).

AMARAL, L. A.; NADER FILHO, 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 de Saúde Pública**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 510–514, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 16. ed. Washington, 1985. 1268 p.

ANDRADE JUNIOR, A.S.; KLAR, A.E. Manejo da irrigação da cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) através do tanques classe A. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.54, n.1-2, 1997.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.38, p.145-180, 2000.

ARAÚJO, A. L.; KONIG, A.; MILANÊZ, J. G.; CEBALLOS, B. S. O. Reuso indireto de esgoto na irrigação de colunas experimentais de solo cultivadas com alface (*Lactuca sativa* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITARIA E AMBIENTAL, 20., 1999, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 119.

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

BARUFALDI, R.; PENNA, T. C. V.; MACHOSVILI, J. A.; EIKA, A. L. Tratamento químico de hortaliças poluídas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.18, p. 225-234, 1984.

BAUMGARTNER, D.; SAMPAIO, S. C.; SILVA, T. R.; TEO, C. R. P. A.; VILAS BOAS, M. A. Reuso da água residuária da piscicultura e da suinocultura na irrigação da cultura da alface. **Engenharia Agrícola**, Sorocaba, v. 27, n. 1, p. 152-163, 2007.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.145-172, 1995.

BENNINI ERY; TAKAHASHI HW; NEVES CSVJ; FONSECA ICB. Teor de nitrato em alface cultivada em sistema hidropônico e convencional. **Horticultura Brasileira** 20: 183- 186, 2002.

BISCARO, G. A.; TOMAZELA, A. B. G.; CRUZ, R. L.; LOPES, M. D. C. Aspectos sanitários do cultivo as alface americana irrigada com água receptoras de efluentes urbanos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 295-301, 2008.

BONILLA, J.A. **Fundamentos da agricultura ecológica**: sobrevivência e qualidade de vida. São Paulo: Nobel, 1992. 260p.

BRACKETT, R. E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and Technology**, Georgia, v.15, n.3, p. 305-311, 1999.

BRANCO, S. M. **Poluição**: a morte de nossos rios. 2. ed. São Paulo: ASCETESB, 1983.

BRANDL, M.; AMUNDSON, R. Leaf age as a risk factor in the contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.74, p.2298-2306, 2008.

CAMPBELL, V. J.; MOHLE-BOETANI, J.; REPORTER, R.; ABBOTT, S.; FARRAR, J.; BRANDL, M.T.; MANDRELL, R.E.; WERNER, S.B. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. **Journal of Infectious Diseases**, Amsterdam, v.183, p.984-987, 2001.

CAPORAL, F.R.; COSTABEBER, J.A. **Agroecologia**: alguns conceitos e princípios. Brasília: MDA/SAF/DATER-IICA, 2004. 24p.

CAPRA, A.; SCICOLONE, B. Water quality and distribution Uniformity in drip/trickle irrigation systems. **Journal of Agricultural Engineering Research**, London, v.70, p.355-365, 1998.

CERVEIRA, R. **Agroecologia e desenvolvimento**: estudo de caso do Grupo Curupira, Jaboti-PR. 2002. 95f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

CHABOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos**: a teoria da trofobiose. Porto Alegre: L & PM, 1987. 272 p.

CONSEA. II Conferência Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional - **Relatório Final**. Centro de Convenções de Pernambuco – Olinda, 17 a 20 de março de 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. In: ROCHA, C. M. (Comp.). **Legislação de conservação da natureza**. 4. ed. São Paulo: FBCN/ CESP, 1986. 720 p.

COOK, K.A.; DOBBS, T.E.; HLADY, W.G.; WELLS, J.G.; BARRETT, T.J.; PUHR, N.D.; LANCETTE, G.A.; BODAGER, D.W.; TOTH, B.L.; GENESE, C.A.; HIGHSMITH, A.K.; PILOT, K.E.; FINELLI, L.; SWERDLOW, D.L.. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with pasteurized orange juice. **JAMA**: The Journal of the American Medical Association, Chicago, v.280, p.1504-509, 1998.

COSTA, E. **Avaliação da produção de alface em função dos parâmetros climáticos em casa de vegetação com sistema hidropônico nos períodos de outono e inverno**. 2001. 168f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.23, n.1, p.158-159, 2005.

CRISTOVÃO, D. A.; IARIA, S. T.; CANDEIAS, J. A. Condições sanitárias das águas de irrigação de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.1, n.1, p.3-11, 1967.

CRADDOCK VM. 1983. Nitrosamines and human cancer: proof of an association. **Nature** v.306, p. 638, 1983.

CUNHA, M.A. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde e Ambiente**, Duque de Caxias, v.1, n.1, p.9-13, 2006.

DANIEL, G. Controle da poluição proveniente dos dejetos da suinocultura, reaproveitamento e valoração dos subprodutos. Curitiba: PUC, 2005. 59p. Trabalho Conclusão Curso

DAROLT, M. R. A qualidade dos alimentos orgânicos. **Conferência Bio Fach**, Rio de Janeiro, set. 2003. Disponível em: < <http://www.planetaorganico.com.br> >. Acesso em: 11 ago. 2007.

DELAQUIS, P.; BACH, S.; DINU, L.-D. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. **Journal of Food Protection**, Amsterdam, v.70, p.1966-1974, 2007.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington, 1997.

ELEMENTOS de apoio para as boas práticas agrícolas e o sistema APPCC. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 204 p. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - EMATER - DF 2007. **Custos de produção - hortaliças bulbos, raízes, folhas e tubérculos** . Disponível em:< <http://www.emater.df.gov.br/>>. Acesso em: 21 fev. 2008.

ERCOLANI, G. L. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.31, p.847-852, 1976.

FALAVIGNA, L. M.; FREITAS, C. B. R.; MELO, G. C.; NISHI, L.; ARAÚJO, S. M.; GUILHERME, A. L. F. Qualidade de hortaliças comercializadas no nordeste do Paraná, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago de Chile, v. 60, p. 144-149, 2005.

FARMER III, J. J.; FANNING, G.R.; DAVIS, B.R.; O'HARA, C.M.; RIDDLE, C.; HICKMAN-BRENNER, F.W. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v.21, p.77-81, 1985.

FAYER, R. et al. Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. **Internacional Journal for Parasitology**, London, v.30, p.1305-1322, 2000.

FERGAN, N.; BARLOW, R.S.; GOBIUS, K.S. *Escherichia coli* O157 somatic antigen is present in an isolate of *E. fergusonii*. **Current Microbiology**, New York, v.52, p.482-486, 2006.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidropônia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2. 195-200, 2002.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FINE DH; ROSS D; ROUNBEHLER DP; SILVERGLEID A; SONG L. Formation *in vivo* of volatíl N-nitrosamines in man after ingestion of cooked bacon and spinach. **Nature** v.265 p.753-755, 1977.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p.27-171.

FRANCO, R. A. M. ; VANZELA, L. S. ; HERNANDEZ, F. B. T. Avaliação biológica da qualidade da água do córrego Três Barras, Marinópolis, SP para irrigação. In: CONIRD- Congresso Nacional de Irrigação e Drenagem, 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2006. CD-ROM.

FRANCO, R. A. M.; HERNANDEZ, F. B. T.; VANZELA, L. S. Utilização dos parâmetros coliformes totais e fecais e oxigênio dissolvido na avaliação da qualidades de água para irrigação na microbacia do córrego Três Barras, Marinópolis, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 36., 2007, Bonito. **Anais...** Bonito: SBEA, 2007. p 1-7.

FRANZ, E. **Ecology and risk assessment of *E. coli* 0157:H7 and *Salmonella typhinmuriun* in the primary production chain of *Lettuce***. 2007. 216f. Tese (Doutorado). Wageningen Universiteit, Wageningen.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, n.3, p.651-660, 2001.

FERNEY, J.; GAVINI, F.; PLOTON, C.; LECLERC, H.; FLEURETTE, J. Isolation of *Escherichia fergusonii* from a patient with septicemia in France. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, London, v.6, p.78, 1987.

FUNKE, G.; HANY, A.; ALTWEGG, M. Isolation of *Escherichia fergusonii* from four different sites in a patient with pancreatic carcinoma and cholangiosepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v.31, p.2201-2203, 1993.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia**: processos ecológicos em agricultura sustentável. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 653 p.

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

GUILHERME, A. F.; ARAÚJO, S. M.; FALAVIGNA, D. L. M.; PUPULIM, A. R. T.; DIAS, M. L. G. G.; OLIVEIRA, S. H.; MAROCO, E.; FUKUSHIGUE, Y. Prevalência de entomoparasitas em horticulturas e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 405-411, 1999.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; FIGUEREDO, H. C. P.; COSTA, G. M.; RODRIGUES, L. S. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n.5, p. 621-623, 2003.

HEDBERG, C. W.; ANGULO, F.J.; WHITE, K. E.; LANGKOP, C. W.; SCHELL, W. L.; STOBIEFSKI, M. G.; SCHUCHAT, A.; BESSER, J.M.; DIETRICH, S.; HELSEL, L.; GRIFFIN, P.M.; MCFARLAND, J.W.; OSTERHOLM, M.T. Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. **Epidemiology and Infection**, v.122, p.385-393, 1999.

HIRANO, S. S.; UPPER, C.D. Diel variation in population size and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.55, p.623-630, 1989.

IBGE. **Censo Agropecuário**: Brasil, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 08 mar. 2008.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods: Significance and methods of enumerations**. 2 ed. Toronto: University of Toronto Press, 1983. 436p.

IEA-CATI. Levantamento de safra. 2005-2006. **Cultura de alface**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/mapa.php>>. Acesso em: 25 out. 2007.

IFOAM. International Federation of Organic Agriculture Movements. **Basic standards of organic agriculture**. Tholey– theley, Germany, 2001.

ISLAM, M.; MORGAN, J.; DOYLE, M.P.; PHATAK, S.C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Foodborne Pathogen Diseases**, v.1, p.27-35, 2004.

KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Piracicaba: ESALQ, 1999. 46 p. Apostila.

KOEFENDER, V.N. **Crescimento e absorção de nutrientes pela alface em fluxo laminar de solução**. 1996. 85f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, p.107-117, 2000.

LÉON, G.S.; CAVALLINI, J.M. **Tratamento e uso de águas residuárias**. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1999. 110 p.

LI, Y.; BRACKETT, R.E.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5 or 15 degrees **Canadian Journal of Food Protection**, Ottawa, v.64, p.305-309, 2001.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.69, p.1875–1883, 2003.

LIPP, E. K.; SCHMIDT, N.; LUTHER, M. E.; ROSE, J. B. Determining the effects of El Niño-Southern Oscillation events on coastal water quality. **Estuaries**, Columbia, v. 24, p. 491-497, 2001.

MAHAPATRA, A.; MAHAPATRA, S. *Escherichia fergusonii*: an emerging pathogen in South Orissa, Ind. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.23, p. 204-208, 2005.

MANDRELL, R. E.; GORSKI, L.; BRANDL, M.T. Attachment of microorganisms to fresh produce. In: SAPERS, G.M.; GORNY, J.R.; YOUSEF, A.E. (Ed.). **Microbiology of fruits and vegetables**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 33-73.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparação (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo**. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARZOCHI, M. C. A. Estudo dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas. II-Estudo da contaminação de verduras e solo de hortas na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 19, p. 148-1556, 1997.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 3. n. 4. out/dez. 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO BRASIL. **Lei nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=5114>. Acesso em: 29 mar. 2008.

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

MOHLE-BOETANI, J.; REPORTER, R.; WERNER, S.B. An outbreak of *Salmonella* serogroup Saphra due to cantaloupes from Mexico. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.180, p.1361-1364, 1999.

NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.70, p.32-35, 2000.

NEVES, M. C. P.; ALMEIDA, D. L. de; DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M.; RIBEIRO, R. de L. D. **Agricultura orgânica**: uma estratégia para o desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis. Seropédica: EDUR, 2004. 98 p.

ODUMERO, J. A.; MITCHELL, S. J.; ALVES, D. M.; LYNCH, J. A.; YEE, A. J.; WANG, S. L.; STYLIADIS, S.; FARBER, J. M. Assessment of the microbial quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 8, p. 954-960, 1997.

OHSE, S.; DOURADO-NETO, D.; MANFRON, P. A.; SANTOS, O. S. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 181-185, 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**, São Paulo, v. 26, n. 4, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Directrices sanitárias sobre el uso de águas residuales em agricultura e aquicultura**. Genebra: OMS, 1989. (Séries de Reportagens Técnicas, 778).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Guías para la calidad del agua potable**. Genebra: OMS, 1995. 195p.

ORMONDE, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FEVERET FILHO, P.; ROCHA, L.T.M. Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. **BNDES Setorial**, Recife, n.15, p. 3-34, 2002.

PANIGASSI, G. **Inquérito populacional sobre a percepção da segurança alimentar intrafamiliar no município de Campinas**. 2005. 148f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PASCHOAL, A. D. **Produção orgânica de alimentos: agricultura sustentável para o século XX e XXI**. Piracicaba: EDUSP, 1994. 323p.

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

PELCZAR, JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2 ed., São Paulo: MAKRON Books, v. 2, 517p. 1997.

PEÑA, R.P. **Rendimento, qualidade e conservação pós-colheita de cenoura (*Daucus carota* L.) sob adubação mineral, orgânica e biodinâmica**. 1996. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PENTEADO, S.R. **Certificação agrícola**. Piracicaba: Editora Via Organica, 2007. 204p.

PRIMAVESI, A. M. **Manejo ecológico dos solos**. 9. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 514 p.

REGNAULT, B.; MARTIN-DELAUTRE S.; LEJAY-COLLIN M.; LEFÈVRE M.; GRIMONT P. A. D. Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichiacoli/Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential applications. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.151, n. 7, p.521-533,2000.

REZENDE, C. L.; FARINA, E. M. H. Q. Assimetria informacional no mercado de alimentos orgânicos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DA NOVA ECONOMIA INSTITUCIONAL, 1., 2001, Campinas. **Anais...** Campinas, 2001.

RIBEIRO, D.A. ***Escherichia coli* isoladas de água de consumo: caracterização fenotípica e genotípica das propriedades de virulência.** 2006. 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROCHA, C. M. B. M.; RODRIGUES, L. S.; COSTA, C. C.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, I. J.; DE JESUS, E. F.; GOMES, E. Avaliação da relação entre os tipos de mananciais e a qualidade de água utilizada na zona rural do município de Lavras-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, 5., 2002, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: SBE, 2002. 458p.

RYDER, E. J. The new salad crop revolution. Reprinted from: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Trends in new crops and new uses.** Alexandria: ASHS Press, 2002.

SANDRI, D. **Irrigação da cultura da alface com água residuária tratada com leitos cultivados com macrófita.** 2003. 207f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SANTAMARTA, A.A.; LAZARO, R.C. Contenido de nitratos en lechugas y espinacas frescas. **Alimentaria**, n. 298, p. 37-41, 1998.

SANTANA, L.R.R.; CARVALHO, R.D.S.; LEITE, C.C.; ALCANTRA T.W.S.O.; RODRIGUES, B.M. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p. 264-269, 2006.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; TALIA, M.; MANNA, A; POMPETTI, F.; FAVARO, M.; FONTANA, C.; FEBBO, F.; BALBINOT, A.; DI BERARDINO, F.; DI BONAVENTURA, G.; DI ZACOMO, S.; ESATTORE, F.; D'ANTONIO, D. Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a Case of Acute Cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.4, p.1551-1552, 2008

SEDIYAMA, M.A.N.; VIDIGAL, S.M.; PEDROSA, M.W.; CLÁUDIA L. O. PINTO, C.L.O.; SALGADO, L. Fermentação de Esterco de suínos para uso como adubo orgânico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, n.6, p.638–644, 2008.

SEDIYAMA, M.A.N. Cultivo protegido de hortaliças em solo e hidroponia. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.200-201, p.1266-133, 1999.

SHEHANE, S. D.; HARWOOD, V. J.; WHITLOCK, J. E.; ROSE, J. B. The influence of rainfall on the incidence of microbial fecal indicators and the dominant sources of faecal pollution in a Florida river. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford , v. 98, p. 1127-1136, 2005.

SILVA, J. P.; MARZOCHI, M. C. A.; CAMILO-COURA, L.; MESSIAS, A. A.; MARQUES, S. Estudo da contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nos supermercados da cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 237-241, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 295 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, M.S.C.; LIMA NETO, V.C. Doenças em cultivos hidropônicos de alface na região metropolitana de Curitiba, PR. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.3, p.275-283, 2007.

SKUTEL, T. A.; GREENBERG, E. R.; DAIN, B. J.; REED, F. C.; JACOBS, N. J. A longitudinal study of rainfall and coliform contamination in small community drinking water supplies. **Environ Sai Technol**, v.24, n.57, p.1-5, 1990.

SOARES, B.; CANTOS G.A. . Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.66, p.154-163, 2005.

SOUTO, R. A. **Avaliação sanitária da água de irrigação e de alfaces (*Lactuca sativa* L.) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba**. 2005. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.

SPEARS, E.E.; KASSOUF, A.L. A segurança dos alimentos: uma preocupação crescente. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.44, p.18-19, 1996.

TAM, N. F. Y.; TIQUIA, S. Assessing toxicity of spent pig litter using a seed germination technique. **Resources, Conservation and Recycling**, v.11, p.261-274, 1994.

TAKAHASHI HW; HIDALGO PC; FADELLI L; CUNHA MET. Composição e manejo da solução nutritiva visando a diminuição do teor de nitrato nas folhas de alface hidropônica. **Horticultura Brasileira** v. 25 p.006-009, 2007.

TAKAYANAGUI, O. M.; OLIVEIRA, C. D.; BERGAMINI, A. M. M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2001.

TAKAYANAGUI, A. M. M. Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 239-241, 2007.

TAUXE, R.; KRUSE, H.; HELDBERG, C.; POTTER, M.; MADDEN, J.; WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce – a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 11, p. 1400-1408, 1997.

THINEY, P. A. O. **Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de *Escherichia coli* em amostras de alfaces e de suas água de irrigação.** 2001. 84 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

TRANI, P.E.; TIVELLI, S.W.; PURQUERIO, L.F.V.; AZEVEDO FILHO, J.A. **Alface (*Lactuca sativa* L.)**. Texto extraído do Boletim 200. Publicado em 09/08/2005. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Alface/Alface.htm>

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

VASCONCELOS, U.; ANDRADE LIMA, M.A.G.; MEDEIROS, L.V.; CALAZANS, G.M.T. Evidência do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* sobre bactérias indicadoras de contaminação fecal da água. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 140, p. 127-131, 2006.

Wu, L.; Ma, L. Q. Effects of sample storage on biosolids compost stability and maturity evaluation. **Journal of Environmental Quality**, v.30, p.222-228. 2001.

YANG, C.-H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN., N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.98, p.3889-3894, 2001.

ZANELLA, F.; LIMA, A.N.L.S.; SILVA,F.F.; SIVALDO MACIEL, S.P.A.; Crescimento de alface hidropônica sob diferentes intervalos de irrigação. **Ciência e agrotecnologia.**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 366 -370, 2008

Anexos

2. Formulários de Identificação das Propriedades

2.1 Cultivo Convencional

1. Que tipo(s) de adubo é utilizado na cultura de alface? E qual a quantidade?
2. Qual o período de tempo que é aplicado este adubo(s)?
3. Qual a origem deste adubo?
4. qual a origem de mudas de alface?
5. Como é feito o controle de pragas? Qual a quantidade de defensivo utilizada?
6. Há transito de animais nos canteiros? Há criação de animais nas proximidades? Que tipo?
7. Onde escorre a água da chuva?
8. De onde provém a água de irrigação? E a água de pré lavagem?
9. Como é feita a colheita?
10. A colheita é realizada por quem? Qual o procedimento higiênico adotado pelas pessoas antes de coletar o produto? Os responsáveis pela coleta são informados da importância da realização da higiene pessoal?
11. Como é armazenado o produto antes da venda? Quem é responsável pelo armazenamento? Estes adotam procedimento higiênico?

12 Como é vendido este produto? Como é transportado até o local da venda?

13. A propriedade tem certificação? Se sim qual o tipo de análise é realizado pela certificadora? Qual a frequência de visitas realizada por esta?

2.2. Cultivo Orgânico

1. Que tipo(s) de adubo é utilizado na cultura de alface? E qual a quantidade?

2. Qual o período de tempo que é aplicado este adubo(s)?

3. Qual a origem deste adubo?

4. qual a origem de mudas de alface?

5. Como é feito o controle de pragas?

6. Há transito de animais nos canteiros? Há criação de animais nas proximidades? Que tipo?

7. Onde escorre a água da chuva?

8. De onde provém a água de irrigação? E a água de pré lavagem?

9. Como é feita a colheita?

10. A colheita é realizada por quem? Qual o procedimento higiênico adotado pelas pessoas antes de coletar o produto? Os responsáveis pela coleta são informados da importância da realização da higiene pessoal?

11. Como é armazenado o produto antes da venda? Quem é responsável pelo armazenamento? Estes adotam procedimento higiênico?

12. Como é vendido este produto? Como é transportado até o local da venda?

13. A propriedade tem certificação? Se sim qual o tipo de análise é realizado pela certificadora? Qual a frequência de visitas realizada por esta?

3.1 Fotos das Propriedades

3.1.1 Propriedades convencionais



Figura 9. Propriedade de Sistema de CC. **A-** Cultivo de alface. **B-** Reservatório de água utilizado para irrigação de hortaliças e coletas de amostras. **C-** Amostras de água coletadas. **D-** Local de pré-lavagem de hortaliças.



Figura 10. Chiqueiro próximo a área de cultivo de alface onde foram coletadas amostras.

3.1.2 Propriedades Orgânicas



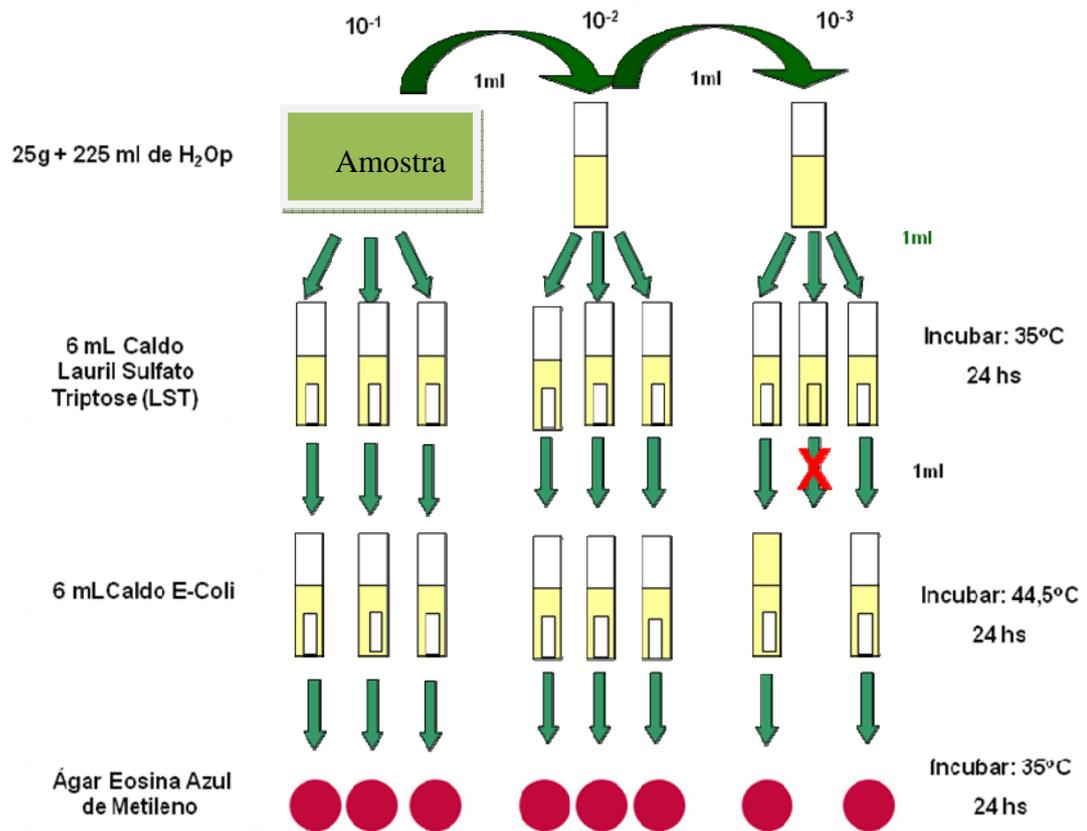
Figura 11. Propriedade de Sistema de CO. **A-** Cultivo de alface. **B-** Reservatório de água utilizado para irrigação de hortaliças e coletas de amostras. **C-** Amostras de água coletadas. **D-** pré-lavagem da alface.

3.2. Fotos dos Experimentos

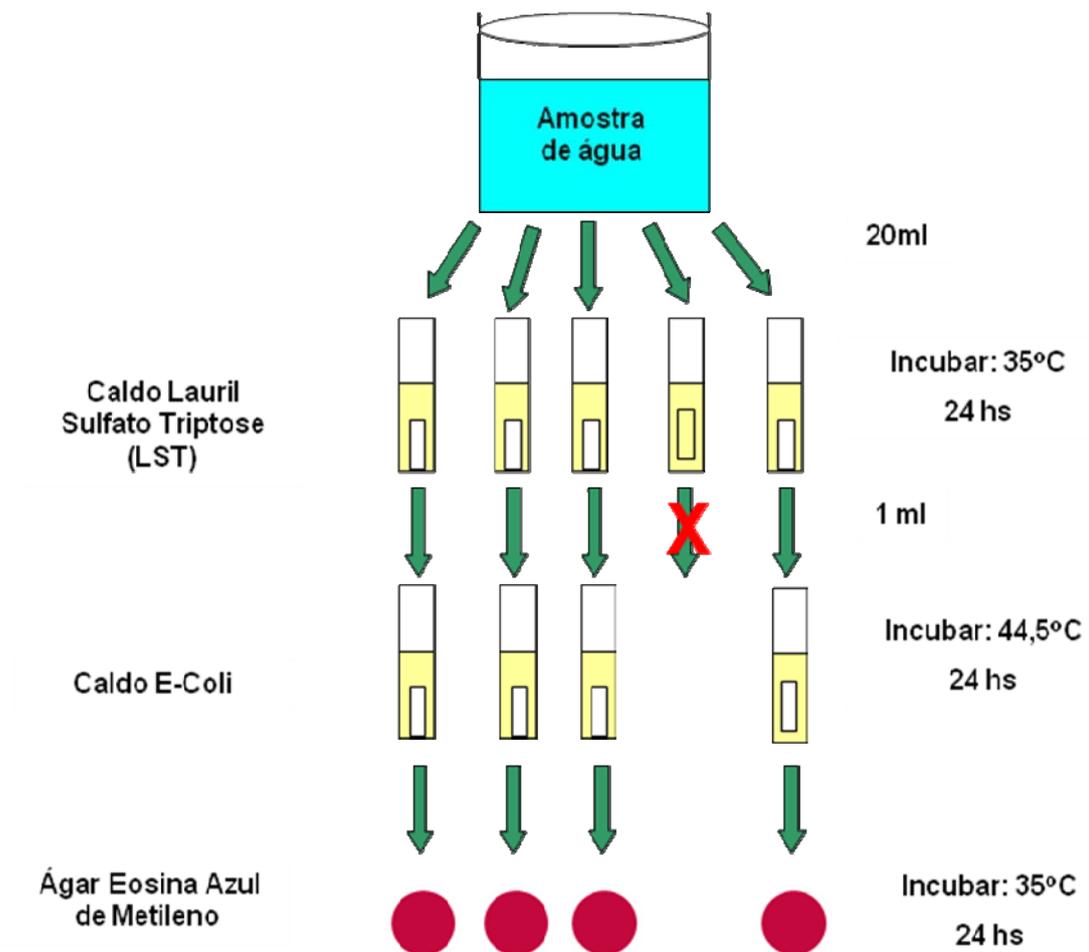


Figura 12. Fotos dos experimentos. **A**-Becker contendo 25g de amostra de alface **B**- processamento da amostra de alface através do mixer devidamente desinfestado. **C**- Alface macerada com água peptonada 1%. **D**-Tubos de ensaio com turbos de Durhan. **E**-Tubos ensaio que apresentam resultados positivos (bolhas no tubo de Durhan). **F**-Resultado positivo no teste confirmativo de *E. coli* no meio EMB.

3.3 Fluxograma de análise para contagem de coliformes fecais e *E. coli* em alface



3.4 Fluxograma de análise para contagem de coliformes fecais e *E. coli* em água



3.5 Fluxograma de análise bioquímica para contagem de coliformes fecais e *E. coli* em alface e água

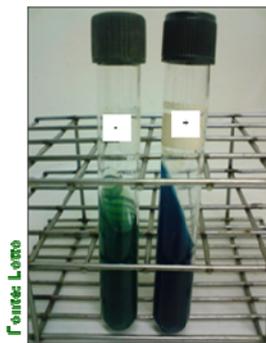


Figura 4. Resultados do teste de citrato.



Figura 6. Resultados do teste de citrato.

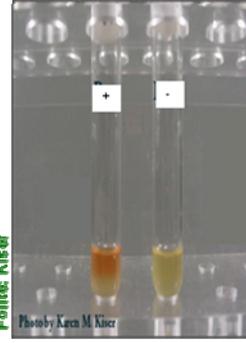


Figura 8. Resultados do teste de Voges-Proskauer.

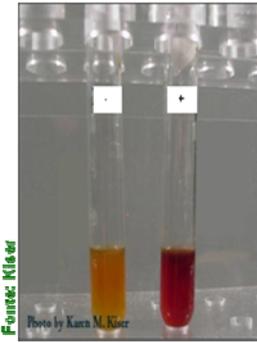


Figura 7. Resultados do teste de vermelho de metila.