



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA HARUMI NIGUMA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ALFACES  
PRODUZIDAS EM PROPRIEDADES RURAIS DE LONDRINA  
– PR, PELO SISTEMA CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

---

Londrina  
2014

NATÁLIA HARUMI NIGUMA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ALFACES  
PRODUZIDAS EM PROPRIEDADES RURAIS DE LONDRINA  
– PR, PELO SISTEMA CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha  
Moreira de Oliveira.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

N689a Niguma, Natália Harumi.

Avaliação microbiológica de alfaces produzidas em propriedades rurais de Londrina – PR, pelo sistema convencional e orgânico / Natália Harumi Niguma. – Londrina, 2014.  
57 f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Microbiologia – Teses. 2. Alimentos – Contaminação – Teses. 3. Alface – Cultivo – Teses. 4. Higiene alimentar – Teses. 5. Água de irrigação – Qualidade – Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

NATÁLIA HARUMI NIGUMA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ALFACES PRODUZIDAS EM  
PROPRIEDADES RURAIS DE LONDRINA – PR, PELO SISTEMA  
CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina R. M. de  
Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jacinta Sanchez Pelayo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wilma Spinosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de Maio de 2014.

Dedico este trabalho à minha família,  
que com todo o amor, me apoiou e  
incentivou para que eu concluísse mais  
uma etapa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela felicidade desta conquista.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira pelos seus ensinamentos, pelo apoio dado durante a elaboração deste trabalho, pelo incentivo para que eu sempre buscasse o meu melhor e pela sua amizade.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jacinta Sanchez Pelayo por me receber no laboratório, pela disponibilização de materiais e equipamentos, e pelas orientações e sugestões dadas no exame de qualificação.

Ao Nilson Ladeia Carvalho e ao Rubens do Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater) por apresentar o projeto de pesquisa aos produtores e pela disponibilidade em me atender sempre que foi necessário.

Aos produtores que se disponibilizaram a participar do projeto e que generosamente doaram as amostras de alfaces utilizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura pelas sugestões concedidas no exame de qualificação.

À Juliane Alves pela generosidade, em dividir seus conhecimentos comigo, pela grande ajuda nas atividades em laboratório, pela dedicação e sobretudo pela amizade.

Às estagiárias Elaine Hoshino e Silvia Passos pelo auxílio na execução das atividades laboratoriais.

Ao Paulo Alfonso Schuroff do Laboratório de Bacteriologia do CCB, UEL, pela disponibilidade em me ajudar nas análises de água.

Aos professores do programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, pelo conhecimento transmitido e dedicação.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CCA/UEL), pela colaboração.

Aos colegas de curso, em especial, Fernanda Henrique, Fernando Sanchez, Bruna Yoshida, Leniza Ludwig, Marcela Colombo, Melina Cardoso, Naiara Ramos, Rodolfo Zanin e Thanise Paroschi, por tornarem os momentos em sala de aula, no laboratório, nos churrascos e reuniões de turma inesquecíveis.

À Andrea Santos lark pelo carinho e apoio.

Aos meus pais, Rubens e Silvana, pelo amor, confiança e incentivo.

À minha irmã Mariani, por sempre me incentivar nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos, Silvia, Heberth e Rafael, pelo carinho e pelo apoio dados principalmente na reta final deste trabalho.

Ao meu noivo, Gustavo, pelo amor, apoio e compreensão.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim.

E a todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

*Podemos escolher recuar em direção à segurança ou avançar em direção ao crescimento. A opção pelo crescimento tem que ser feita repetidas vezes. E o medo tem que ser superado a cada momento.*

*Abraham Maslow*

NIGUMA, Natália Harumi. **Avaliação microbiológica de alfaces produzidas em propriedades rurais de Londrina – PR, pelo sistema convencional e orgânico.** 2014. 57f. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão microbiológico (coliformes totais, coliformes a 45 °C, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.) de alfaces cresas (*Lactuca sativa*) produzidas pelo sistema convencional e orgânico e comercializadas na região de Londrina – PR, e também avaliar o padrão microbiológico da água utilizada para a irrigação nas diferentes propriedades rurais estudadas. Quatro propriedades rurais foram avaliadas neste trabalho, das quais três eram produtoras de alfaces convencionais (A, B e C) e uma era produtora orgânica (D). Um total de 111 amostras foram coletadas, sendo 71 amostras de alfaces convencionais e 40 amostras de alfaces orgânicas. Amostras de um mesmo lote antes e após a higienização para comercialização foram avaliadas. Oito amostras de água para a irrigação foram coletadas nas diferentes propriedades para avaliação do padrão microbiológico, utilizando a técnica do Colilert®. Para a pesquisa de coliformes totais, coliformes a 45 °C e *E. coli*, empregou-se o método de Número Mais Provável (NMP/g). O método tradicional de cultura e a técnica da reação em cadeia da polimerase foram empregados para a pesquisa de *Salmonella* spp. As contagens de coliformes a 45 °C estavam acima do permitido pela legislação brasileira, em 2,8 % (2/71) das amostras de alfaces produzidas pelo sistema convencional. Em uma amostra (1,3 %) de um lote de alface convencional, coletada antes do processo de higienização, foi isolado *Salmonella* spp. Em relação às alfaces produzidas pelo sistema orgânico, 12,5 % (5/40) apresentaram contagens de coliformes a 45 °C acima do limite estabelecido pela legislação brasileira e não foi isolado *Salmonella* spp. A água utilizada para a irrigação em três das quatro propriedades rurais estudadas (duas convencionais e a orgânica) apresentaram resultados insatisfatórios ( $> 10^2$  NMP/100mL) quanto às contagens de *E. coli*. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as condições higiênico-sanitárias das alfaces analisadas, produzidas pelo sistema convencional, foram, na maioria das amostras, satisfatórias. Em relação aos resultados obtidos com a análise de alfaces produzidas pelo sistema orgânico, é importante salientar que as práticas de produção exigidas pelas certificadoras devem ser aplicadas para o padrão microbiológico exigido pela legislação.

**Palavras-chave:** Coliformes a 45 °C. Coliformes totais. *Salmonella* spp. Água de irrigação. Hortaliças.

NIGUMA, Natália Harumi. **Microbiological evaluation of lettuce produced in farms in Londrina – PR, by conventional and organic cropping system.** 2014. 57p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

### ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the microbiological pattern (total coliforms, thermotolerants coliforms, *E. coli* and *Salmonella* spp.) of lettuce (*Lactuca sativa*) produced by conventional and organic system marketed in Londrina – PR, and also assess the microbiological standard of irrigation water used in the different farms studied. Four farms were evaluated in this study, three of them were conventional producers (A, B and C) and one was an organic producer (D). A total of 111 samples were analyzed, 71 samples of traditionally grown lettuce and 40 samples of organically grown lettuce. Samples from the same batch before and after cleaning were evaluated. Eight samples of irrigation water were taken from the different farms for evaluation of the microbiological standard, using the Colilert®. Total and thermotolerants coliforms determination was performed by the Most Probable Number technique (MPN/g). The traditional culture method and the Polymerase Chain Reaction were employed for the *Salmonella* spp detection. Two samples (2,8 %) traditionally grown had thermotolerants counts above the recommended level. *Salmonella* spp. was isolated from a sample traditionally grown lettuce that was collected before the cleaning process. Regarding organically grown lettuce, 12.5 % (5/40) had thermotolerant coliforms counts above the limit established by Brazilian legislation and *Salmonella* spp was not detected. The irrigation water used in three of four farms studied (two conventional and one organic) had *E. coli* counts unsatisfactory ( $> 10^2$  NMP/100mL). The results of this study demonstrated that the sanitary conditions of lettuce produced by the conventional system were, in the most cases, satisfactory. But the results obtained for lettuces produced by organic system, showed that the production practices required for certification should be apply to maintain the microbiological standard required by legislation.

**Key words:** Thermotolerant coliforms. Total coliforms. *Salmonella* spp. Irrigation water. Vegetables.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Surtos envolvendo alimentos de origem vegetal contaminados por STEC/EHEC ocorridos nos Estados Unidos .....	25
Tabela 2 – Surtos envolvendo alimentos de origem vegetal contaminados por <i>Salmonella</i> ocorridos nos Estados Unidos .....	27
Tabela 3 – Principais características das propriedades rurais estudadas.....	31
Tabela 4 – Número das amostras de alface coletadas em cada propriedade e número de amostras de cada lote coletadas antes e após o processo de higienização .....	32
Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de <i>Salmonella</i> spp. no ensaio PCR.....	34
Tabela 6 – Contagens de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de <i>E. coli</i> obtidas em amostras de alfaces crespas produzidas em três propriedades rurais pelo sistema convencional .....	37
Tabela 7 – Contagens de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de <i>E. coli</i> obtidas em amostras de alfaces crespas produzidas na propriedade de produção orgânica.....	41
Tabela 8 – Contagem de coliformes totais e <i>E. coli</i> em amostras de água para a irrigação coletadas nas diferentes propriedades .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
≥	Maior ou igual
°C	Grau Celsius
A/E	Lesões <i>Attaching/effacement</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AMS	<i>Agriculture Marketing Service</i>
BS	Ágar Bismuto Sulfito
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CCB	Centro de Ciências Biológicas da UEL
CH	Colite hemorrágica
CL	Caldo Lactose
CLBVB	Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAEC	<i>E. coli</i> de Aderência Difusa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleosídeos trifosfatados
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
g	Força G

h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HE	Ágar Hektoen
IFOAM	International Federation of Organic Agriculture Movements (Federação Internacional de Movimentos de Agricultura Orgânica)
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilogramas
LACEN	Laboratório Central do Estado
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
LSS	Caldo Lauril Sulfato de Sódio
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mol	Massa molar
MUG	4-metil-umbeliferil
NMP	Número Mais Provável
NMP/g	Número Mais Provável por grama
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONPG	o-nitrofenol-β-D-galactopiranosídeo
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PTT	Púrpura trombocitopênica trombótica
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Estado do Paraná
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional da Vigilância Sanitária
RV	Rappaport-Vassiliadis
s	Segundos
SC	Caldo Selenito-Cistina
SHU	Síndrome Hemolítico-Urêmica
SPI-1	Ilha de patogenicidade 1 de <i>Salmonella</i>

SPI-2	Ilha de patogenicidade 2 de <i>Salmonella</i>
ST	Toxina termoestável
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TA	Temperatura ambiente
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
TT	Tetracionato
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/g	Unidades formadoras de colônias por grama
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UV	Ultravioleta
V	Volt
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µL/mL	Microlitro por mililitro
µM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
	3.1 AGRICULTURA ORGÂNICA.....	18
	3.2 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS NO CAMPO.....	19
	3.3 <i>SALMONELLA</i> SPP. E SALMONELOSE .....	21
	3.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	23
	3.4 SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE LEGUMES E VERDURAS FRESCAS .....	26
	3.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. E <i>E. COLI</i> .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
	4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA CONVENCIONAL E ORGÂNICO NA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ.....	31
	4.1.1 Amostragem.....	31
	4.1.2 Análise microbiológica para detecção de <i>E. coli</i> e de <i>Salmonella</i> spp. em alfaces orgânicas e convencionais.....	32
	4.2 ENSAIO PCR PARA PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EM ALFACES ORGÂNICAS E CONVENCIONAIS.....	34
	4.2.1 Extração de DNA.....	34
	4.2.2 PCR para detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	34
	4.2.3 Análise dos produtos de amplificação .....	35
	4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO MICROBIOLÓGICO DA ÁGUA UTILIZADA PARA IRRIGAÇÃO DAS ALFACES CRESPAS CONVENCIONAIS E ORGÂNICAS .....	35
	4.3.1 Coleta das amostras da água para irrigação.....	35
	4.3.2 Análise microbiológica das amostras pela técnica do Colilert®.....	36

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA CONVENCIONAL .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA ORGÂNICO .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DO PADRÃO MICROBIOLÓGICO DA ÁGUA UTILIZADA PARA IRRIGAÇÃO DAS ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA CONVENCIONAL E ORGÂNICO .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ingestão de hortaliças cruas constitui um importante meio de transmissão de várias doenças infecciosas causadas por microrganismos. A contaminação pode ocorrer desde o cultivo até a manipulação anterior ao consumo (TAKAYANAGUI *et al.*, 2001; MOCELIN; FIGUEIREDO, 2009). A alface (*Lactuca sativa*) é considerada a hortaliça mais popular devido ao sabor suave, a fácil produção e à adaptabilidade a qualquer tipo de solo, e ao baixo preço (ABREU *et al.*, 2010).

A produção dos alimentos orgânicos é caracterizada pela limitação do uso de produtos químicos e medicamentos na produção animal, a fim de se reduzir o impacto ambiental (ARBOS *et al.*, 2010). A agricultura orgânica apresentou um grande crescimento nos últimos anos nos Estados Unidos, Europa e também no Brasil. A demanda por estes produtos cresce constantemente, principalmente pela concepção de que são mais saudáveis e seguros que os alimentos produzidos convencionalmente (MAGKOS *et al.*, 2003; WILLER; KLICHER, 2009).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (EUA) relatou um aumento no número de surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a alimentos de origem vegetal. Vários fatores podem ser atribuídos ao aumento destes surtos, dentre eles o aumento da preocupação com a saúde, que estimulou as dietas ricas em fibras, presentes em frutas e vegetais frescos. A expansão do comércio mundial que permitiu a ampla distribuição de todos os tipos de produtos, e a sua disponibilidade durante o ano todo, no entanto, também contribuiu para o aumento do risco de doenças. Dentre os diversos surtos, os vegetais crus foram identificados como fontes de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC), que causa a diarreia do viajante. Em 2011, foi notificado um surto envolvendo brotos de alfafa contaminados por *E. coli* O104:H4 com vários casos de Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) no norte da Alemanha e em outros países da Europa, nos Estados Unidos e no Canadá. Surtos de salmonelose também têm sido atribuídos ao consumo de tomates, brotos de feijão, melão e melancia (SEOW *et al.*, 2012).

*Salmonella* spp. foi responsável por 42,3 % e *E. coli* por 10,5 % dos surtos que ocorreram no Brasil entre 2000 e 2011. As hortaliças foram responsáveis

por 12,5 % desses surtos (SVS, 2011). O número de casos e surtos envolvendo estes microrganismos, provavelmente, é muito maior, visto que muitas vezes não são notificados aos órgãos de vigilância sanitária. Sabe-se que isolados de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enteroagregativa (EAEC) são agentes infecciosos isolados com frequência, como causa de diarreia em crianças no Brasil (ARANDA *et al.*, 2007).

Técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornou-se uma valiosa ferramenta na detecção de microrganismos patogênicos e na investigação de surtos de origem alimentar. A PCR consiste em um método alternativo que apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como rapidez, sensibilidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias de difícil cultivo (RIYAZ-UI-HASSAN; VERMA; QAZI, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação por coliformes totais, coliformes a 45 °C, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em alfaces (*Lactuca sativa*) produzidas pelo sistema convencional e orgânico comercializadas na região de Londrina – PR.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o padrão microbiológico de alfaces crespas (*Lactuca sativa*) produzidas e comercializadas na região de Londrina, PR.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a contaminação por *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes a 45 °C e de *Escherichia coli* em alfaces crespas (*Lactuca sativa*), produzidas pelo sistema convencional e orgânico, comercializadas na região de Londrina, Paraná.

Avaliar o padrão microbiológico da água empregada na irrigação das alfaces nas propriedades rurais estudadas.

Validar ensaio PCR, padronizado anteriormente para detecção de *Salmonella* spp., para a análise de alfaces.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AGRICULTURA ORGÂNICA

A agricultura tradicional utiliza grandes quantidades de fertilizantes químicos e agrotóxicos. A preocupação da sociedade em relação aos danos ambientais e aos riscos à saúde vinculados ao uso destes produtos, impulsionou os agricultores a buscarem sistemas alternativos de produção (BETTIOL *et al.*, 2004; MAFFEI; SILVEIRA; CATANOZI, 2013).

A agricultura orgânica tem atraído atenção, pois é um sistema de produção caracterizado por eliminar a aplicação de fertilizantes, agrotóxicos, reguladores de crescimento ou aditivos para alimentação animal. Fundamenta-se no uso de esterco animal, rotação de culturas, adubação verde, compostagem e controle biológico de pragas e doenças. Visa ao aproveitamento eficiente dos recursos naturais, bem como à preservação do meio ambiente, ao desenvolvimento econômico e à qualidade de vida (HINTERHOLZ; RIBEIRO, 2011).

O aumento do interesse pelos produtos orgânicos corroborou para que o governo criasse medidas de controle de produção e comercialização destes produtos. A Lei 10.831/2003 e o Decreto 6.323/2007 (BRASIL, 2003; 2007) deram início à regulamentação no país. Segundo estes documentos, a agricultura orgânica compreende todos os sistemas agrícolas que promovam a produção sustentável de alimentos, fibras e outros produtos que não alimentos (como cosméticos, óleos essenciais, etc.) de modo ambiental, social e economicamente responsável (FONSECA *et al.*, 2009). Segundo estas regulamentações, para que um produto seja considerado orgânico, deve ser certificado por um órgão. A denominação "produto orgânico" deverá ser mencionada no rótulo e deve constar na embalagem um "selo de qualidade" da entidade certificadora credenciada.

Segundo dados da IFOAM (*International Federation of Organic Agriculture Movements*) no estudo "*The world of organic agriculture: 2014*" a área destinada à produção de orgânicos no mundo é de 37,5 milhões de hectares. A América Latina apresenta cerca de 300 mil produtores que cultivam 6,8 milhões de hectares, o que representa 18 % das terras destinadas à agricultura orgânica no mundo. Os principais países produtores da América Latina são Argentina (3,6 milhões de hectares), Uruguai (900 mil hectares) e Brasil (700 mil hectares). O Brasil

é considerado um grande consumidor em nível mundial, no entanto, 60 % dos rendimentos com produtos orgânicos são gerados pelas exportações (IFOAM, 2014). A produção orgânica brasileira concentra-se nos estados do sul e sudeste. Os principais produtos cultivados são a soja, hortaliças, frutas e cana de açúcar (CAMARGO FILHO *et al.*, 2004; HAMERSCHMIDT, 2005).

A distribuição e comercialização dos produtos orgânicos no mercado interno são praticadas, predominantemente, pelo próprio produtor ou em feiras de produtos orgânicos, que estimulam o desenvolvimento do mercado local e constitui numa forma de apoiar os produtores ainda não certificados (BUAINAIN; BATALHA, 2007), mas também estão disponíveis nas maiores redes de supermercados do país, as quais oferecem suas próprias marcas orgânicas (IFOAM, 2014).

Segundo dados da *Organics* Brasil, em 2013 o segmento apresentou faturamento mundial de 62 bilhões de dólares (US\$ 62 bilhões), sendo que a maior parcela do rendimento foi dos Estados Unidos (US\$ 35 bilhões), seguido da Alemanha (US\$ 7 bilhões) e do Canadá (US\$ 4,4 bilhões). O mercado interno brasileiro ainda é pequeno, mas apresenta um grande potencial de crescimento. Assim, torna-se necessário o aumento da demanda gerada pelos consumidores, a consolidação das medidas do governo para a regularização do setor e a agregação de valor aos produtos deste segmento agrícola (ANÔNIMO, 2014a; ANÔNIMO, 2014b; LIU, 2014).

### **3.2 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS NO CAMPO**

As principais fontes de contaminação dos alimentos no campo são o uso de esterco contaminado ou inadequadamente compostado, o uso de água contaminada para irrigação, o escoamento para os canteiros de produção de esgoto não tratado ou da água proveniente de operações relacionadas ao gado bovino e a animais selvagens ou domésticos (DOYLE; ERICKSON 2008).

O emprego de água contendo esgoto ou efluentes tratados de forma inadequada para irrigação pode contaminar legumes e verduras por vírus e parasitas e também levar ao aumento da contaminação por bactérias, tais como *E. coli* e *Salmonella* spp. (BEUCHAT; RYU, 1997; BENJAMIN *et al.*, 2013).

Microrganismos patogênicos quando contaminam águas subterrâneas ou superficiais em uma propriedade rural, por meio da irrigação, podem infectar animais e humanos pela ingestão dos alimentos cultivados nesta propriedade. É possível que as bactérias patogênicas que estão presentes em baixos níveis na água, se multipliquem quando expostas a condições ambientais favoráveis ou à disponibilidade de nutrientes (GAGLIARDI; KARNS, 2000).

A origem e a distribuição das águas destinadas à irrigação devem ser conhecidas para limitar a contaminação do solo e dos alimentos por bactérias patogênicas. Poços devem ser bem construídos e conservados e, todas as fontes de irrigação precisam ser monitoradas (BUCK; WALCOTT; BEUCHAT, 2003; BERALDO, 2010). Apesar do risco de transmissão de uma série de doenças ao homem, águas contaminadas têm sido utilizadas indiscriminadamente na irrigação e como consequência, tem-se observado a presença de *E. coli* diarréiogênicas, *Salmonella* spp. e parasitas intestinais em hortaliças e frutas (MAROUELLI; SILVA, 1998).

A resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil (CONAMA) de 17 de Março de 2005, classifica as águas doces em classe especial e classes 1, 2, 3 e 4, de acordo com sua qualidade e aplicação. A água deve ser da classe 1 quando utilizada para a irrigação de hortaliças, que são consumidas cruas, e de frutas que se desenvolvem próximas ao solo e que são ingeridas cruas, sem a remoção da casca. As águas destinadas ao consumo humano, após tratamento simplificado também devem ser da classe 1. A contagem de coliformes a 45 °C para água doce da classe 1 não deverá exceder o limite de  $2,0 \times 10^2$  de coliformes a 45 °C por 100 mililitros. A contagem de *E. coli* pode substituir o padrão coliformes a 45 °C (BRASIL, 2005).

Vários fatores como disponibilidade e custo, determinam a fonte de água utilizada para a irrigação. Devido à ação filtrante do solo e outras estruturas sobrejacentes à fonte de água, maiores concentrações de *E. coli* e outras bactérias são geralmente esperadas nas fontes de água superficiais (rios e lagos, por exemplo) em relação às subterrâneas (como, poços artesianos e rasos). *E. coli* e *Salmonella* spp. em contato com águas, tanto superficiais quanto subterrâneas, podem sobreviver por dias ou meses (BENJAMIN *et al.*, 2013).

A contaminação dos alimentos a partir do esterco também se tornou uma preocupação e as principais fontes são as fezes de animais selvagens ou em

pastagens, utilização de esterco cru como fertilizante ou o emprego de adubo inapropriadamente compostado. Outras fontes de contaminação incluem as fezes dos alojamentos de animais confinados e as áreas onde este esterco é armazenado, porque pode ocorrer o escoamento (lixiviação) para os campos e fontes de água (GAGLIARDI, 2000). *E. coli* O157:H7 pode sobreviver e se multiplicar no solo, principalmente na presença de esterco (WATCHEL; WHITEHAND; MANDRELL, 2002).

Diferenças na alimentação animal, a ausência de fertilizantes sintéticos e pesticidas e o uso de antibióticos, podem levar a diferenças na prevalência e sobrevivência de patógenos entre os sistemas orgânico e convencional. Em razão de o esterco ser o principal fertilizante usado na produção orgânica, sua segurança microbiológica é a grande questão levantada quanto ao cultivo de frutas, legumes e verduras por este sistema. Não tem sido evidenciado que o risco de contaminação seja maior no sistema orgânico do que no convencional (PELL, 1997; GAGLIARDI; KARNS, 2000; AMS, 2000; FRANZ *et al.*, 2005).

### **3.3 SALMONELLA SPP. E SALMONELOSE**

O gênero *Salmonella* compreende duas espécies de *Salmonella*, denominadas de *S. bongori* e *S. enterica*. *S. enterica* é dividida em seis subespécies incluindo *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. De acordo com o esquema de Kauffmann-White, as subespécies são divididas em sorovares, os quais podem ser diferenciados pela sorotipagem, que é baseada na variabilidade antigênica das frações do lipopolissacarídeo (antígeno somático O), das proteínas flagelares (H – fase 1 e 2) e dos polissacarídeos capsulares (Vi) (FREITAS, 2008; DUNKLEY *et al.*, 2009; MALORNY *et al.*, 2009).

A espécie *Salmonella subterranea* foi isolada e identificada em Oak Ridge, EUA, em 2004, e poderá ser incorporada ao Sistema de Nomenclatura do Centro de Prevenção e Controle de Doenças, Atlanta (CDC – *Centers of Disease Control and Prevention*). Essa espécie apresentou similaridade de 96,4 % com *Salmonella bongori* (SHELOBOLINA *et al.*, 2004; SU; CHIU, 2007).

A infecção por *Salmonella* em humanos pode levar a gastroenterite autolimitada com sintomas brandos a moderados, incluindo náusea, vômito, febre, dor abdominal e diarreia. Sintomas clínicos mais graves podem ocorrer em casos de bacteremia ou febre entérica, os quais são caracterizados por cefaleia severa e febre alta, porém sem a manifestação da diarreia (LEADER *et al.*, 2009).

*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são epidemiologicamente os sorovares mais importantes, pois são responsáveis por mais de 80% das infecções em humanos no mundo. Na Europa, *S. Enteritidis* está envolvida em mais de 60% dos casos de salmonelose em humanos (MALORNY *et al.*, 2009). A gastroenterite por *Salmonella* spp. passou a ser a principal doença transmitida por alimentos a partir de 1995 no Paraná. Dos alimentos associados aos surtos que ocorreram nesse Estado entre 1999 e 2008, 45,0% foram alimentos à base de ovos, 34,8% carnes e derivados e 20,2% classificados como alimentos variados, tais como queijos, saladas, arroz cozido, extrato de tomate, fritas, mandioca, mousse, pudim, sorvetes, farofas, pavês e massas prontas (KOTTWITZ *et al.*, 2010).

A invasão de células do epitélio intestinal por *Salmonella* spp. é o principal fator de virulência. O processo de internalização é complexo e envolve muitos genes. A translocação de proteínas para o interior da célula hospedeira e a consequente alteração das funções celulares é outro fator importante de virulência. Os genes relacionados aos fatores de virulência da *Salmonella* podem se localizar em plasmídios, porém a maioria está disposta em ilhas de patogenicidade. *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI), que são definidas como amplas regiões cromossômicas responsáveis por codificar fatores determinantes associados à interação entre o patógeno e a célula hospedeira (MARCUS *et al.*, 2000). Os sorovares de *S. enterica* expressam pelo menos dois tipos de sistemas de secreção do tipo III, codificados pelas SPI-1 e SPI-2, que possuem funções diferentes durante o ciclo patogênico. A expressão do SPI-1 está relacionada ao início da infecção no epitélio intestinal e o SPI-2 tem importância no estabelecimento da infecção sistêmica (FREITAS, 2008; LOPES, 2011).

SPI1 contém um grupo de genes chamados *inv*, que juntamente com outros genes, como *spa*, *prg* e *org*, codificam o sistema de secreção do tipo III. Esse sistema constitui um conjunto de vinte proteínas que formam um canal na membrana da célula do epitélio intestinal e provoca várias respostas celulares, dentre elas, o rearranjo do citoesqueleto da célula epitelial, que leva à interiorização da bactéria e

ao estímulo à produção de citocinas da resposta inflamatória, responsáveis pela diarreia e inflamação intestinal (SALYERS; WHITT, 2002; FREITAS, 2008). As proteínas efetoras codificadas pelo SPI-2 são responsáveis pela sobrevivência das bactérias dentro dos macrófagos (CASTILLA, 2003).

O grupo de genes *invABC* e *invD* permitem que a *Salmonella* penetre nas células epiteliais. Os genes *invABC* estão arrançados na mesma unidade transcripcional, enquanto que o *invD* localiza-se numa unidade diferente. Galan e Curtiss III (1991) estudaram vários sorovares de *Salmonella* e constataram que as cepas que não apresentavam o gene *invA* não expressavam os genes *invABC*, e portanto, eram incapazes de invadir as células do epitélio intestinal, demonstrando a importância deste *operon* na patogenicidade da bactéria. Em 1992, Galan e colaboradores demonstraram que a proteína *invA* pertence a uma família de proteínas, as quais possuem a função de transportar proteínas específicas através da membrana celular bacteriana (GALAN e CURTISS III, 1991; GALAN; GINOCCHIO; COSTEAS, 1992; CASTILLA, 2003).

Rahn *et al.* (1992) utilizaram o gene *invA* na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Salmonella* mostrando que este gene pode ser empregado na diferenciação de *Salmonella* de outros microrganismos. Das 630 cepas diferentes avaliadas por estes autores apenas duas cepas não puderam ser identificadas (RAHN *et al.*, 1992).

### **3.3 ESCHERICHIA COLI**

Os coliformes totais constituem um grupo de bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 a 48 horas a 35 °C. O grupo de coliformes a 45 °C ou coliformes termotolerantes tem a mesma definição dos coliformes totais, porém são capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 a 48 horas a 45 °C. *E. coli* e algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais. A presença desse grupo nos alimentos não indica necessariamente contaminação fecal, sendo a enumeração da *E. coli* o melhor

indicador conhecido (FRANCO e LANDGRAFF, 2004; SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Alguns isolados de *E. coli* têm a capacidade de causar doenças intestinais e são chamadas de *E. coli* diarreiogênicas. Os grupos enteropatogênicos de *E. coli* diarreiogênicas são *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Produtora de toxina Shiga (STEC/EHEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* Enteroagregativa (EAEC); *E. coli* de Aderência Difusa (DAEC); *E. coli* Aderente Invasiva (AIEC) e *E. coli* Enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEAC) (KAPER *et al.*, 2004; BRZUSZKIEWICZ *et al.*, 2011; CLEMENTS *et al.*, 2012).

Os grupos de *E. coli* diarreiogênicas apresentam fatores de virulência codificados por genes carregados por elementos móveis. Estes elementos móveis incluem plasmídeos (genes das toxinas de ETEC), transposons (toxina ST de ETEC), ilhas de patogenicidade (vários genes de EPEC e EHEC) e bacteriófagos (toxina Shiga de STEC/EHEC). O transporte dos genes de virulência em elementos móveis pode ser a razão da variedade de grupos enteropatogênicos de *E. coli* (SALYERS; WHITT, 2002).

Os sorotipos de *E. coli* diarreiogênicas mais comumente relatados em crianças no Brasil pertencem aos grupos EPEC e EAEC (ARANDA *et al.*, 2007). As infecções por EPEC ocorrem mais frequentemente em crianças menores de dois anos de idade. A dose infectante para crianças não é conhecida, mas presume-se que seja bem menor que a dos adultos porque estudos mostraram que EPEC pode causar infecção em adultos somente se o inóculo for grande. A razão para a maior resistência em adultos e crianças acima de dois anos de idade não foi elucidada, mas a perda de receptores específicos com o aumento da idade pode ser uma hipótese (NATARO e KAPER, 1998).

O grupo STEC/EHEC é mais relacionado a quadros clínicos severos, como a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). Outros sintomas da STEC/EHEC são a diarreia aquosa, a diarreia sanguinolenta e a colite hemorrágica (CH). Indivíduos de todas as idades podem contrair a doença por STEC, porém crianças menores de cinco anos e idosos são mais susceptíveis às complicações graves da doença (PATON; PATON, 1998; XIA *et al.*, 2010).

Os sintomas clínicos da infecção por STEC ocorrem pela ação da

toxina Shiga produzida no intestino, que passa para a corrente sanguínea e danifica as células endoteliais e renais, e pela ação tóxica direta oclue a microvasculatura e induz a liberação de citocinas e quimiocinas, resultando na inflamação renal. Este dano pode levar a SHU, a qual é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda. As toxinas também induzem a apoptose em células epiteliais intestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WATTERWORTH et al., 2004; XIA *et al.*, 2010).

O grupo EHEC foi descrito para designar isolados que causam CH e ou SHU, que além de produzirem a toxina Shiga, possuem o gene *eae*, responsáveis pelas lesões A/E (*attaching/effacement*), e o gene *hlyA*, que codifica uma hemolisina (XIA et al., 2010). EHEC é considerada um subgrupo das STEC (NATARO; KAPER, 1998; DEAN; MARESCA; KENNY, 2005; ARANDA *et al.*, 2007; STELLA, 2009; VIEIRA, 2009). O principal reservatório de EHEC é o trato intestinal de bovinos e os primeiros surtos foram associados ao consumo de hambúrgueres mal processados termicamente (O'BRIEN et al., 1993; RANGEL et al., 2005). Posteriormente, uma grande variedade de produtos foram associados à doença, incluindo salsichas, leite não pasteurizado, alface, melão *cantaloupe* e suco de maçã (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; XIA *et al.*, 2010). A tabela a seguir mostra surtos envolvendo alimentos de origem vegetal contaminados por *E. coli* que ocorreram nos Estados Unidos nos últimos anos.

Tabela 1 – Surtos envolvendo alimentos de origem vegetal contaminados por STEC/EHEC ocorridos nos Estados Unidos\*.

<b>Alimento (patotipo)</b>	<b>Nº de infectados</b>	<b>Nº de hospitalizações</b>	<b>SHU<sup>1</sup></b>	<b>Nº de óbitos</b>	<b>Ano</b>
<b>Espinafre fresco</b> (EHEC)	199	102	31 casos	3	2006
<b>Alface minimamente processada</b> (STEC)	26	12	3 casos	-	2010
<b>Alface romana</b> (EHEC)	58	33	3 casos	-	2012
<b>Espinafre orgânico</b> (EHEC)	33	15	2 casos	-	2013

<sup>1</sup> Síndrome Hemolítico-Urêmica

\* Dados obtidos do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Estados Unidos).

### 3.4 SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE LEGUMES E VERDURAS FRESCAS

Nos últimos anos, a segurança de alimentos passou a ser um assunto de interesse não somente dos órgãos governamentais, de profissionais da saúde e da indústria de alimentos, mas também dos consumidores. Esse interesse aumentou principalmente, com a introdução de organismos geneticamente modificados, a produção de alimentos irradiados, o aparecimento dos surtos de encefalopatia espongiforme bovina e das infecções por *E. coli* diarreioogênicas. Esses fatos refletiram na ampliação da demanda por alimentos orgânicos e a preferência por estes produtos tem sido associada a múltiplos fatores, dentre eles, o aumento da preocupação com a saúde, o bem-estar animal e a proteção do meio ambiente. Como consequência, os consumidores passaram a considerar que os produtos cultivados convencionalmente oferecem maiores riscos à saúde, e em contrapartida, que os alimentos orgânicos são mais saudáveis e seguros (MAGKOS *et al.*, 2003; MAGKOS; ARVANITI; ZAMPELAS, 2006).

Por outro lado, algumas características da produção orgânica, como a aplicação de adubo compostado e a eliminação de agrotóxicos, sugerem que o risco de contaminação por microrganismos patogênicos pode aumentar e tornar o alimento não adequado ao consumo. Smith (1993) defende que a contaminação microbiológica depende, principalmente, das práticas de produção adotadas na propriedade e das condições ambientais e, por isso, tanto os alimentos orgânicos quanto os convencionais estariam sujeitos ao mesmo risco.

A compostagem é um processo de transformação de resíduos vegetais (ricos em carbono, como galhos, folhas, capim) e resíduos animais (fontes de nitrogênio, como esterco, cama de aviário) em material utilizado como fertilizante na agricultura. Este processo é promovido pelos microrganismos existentes no solo que fermentam aerobicamente a matéria orgânica *in natura*, retirando a umidade e oxigênio do ar, liberando gás carbônico, água e energia. Parte desta energia é utilizada para o crescimento e reprodução, o restante é liberado como calor, causando um grande aquecimento na pilha de compostagem que destroem os microrganismos patogênicos, em especial os não esporulados. O processo de fermentação se completa quando a temperatura da pilha é igual à temperatura ambiente (SOUZA; RESENDE, 2006; COSTA, 1985).

O aumento do número de surtos relacionados a alimentos frescos ou minimamente processados tem sido associado à contaminação fecal. Alguns patógenos podem sobreviver até 59 dias sob condições de compostagem. E mesmo que este processo seja efetivo, somente as formas vegetativas dos microrganismos são destruídas, sendo que as formas esporuladas de *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* permanecem viáveis (KOUBA, 2003). O esterco pode carrear agentes infecciosos para o solo, e enquanto alguns morrem em pouco tempo, outros persistem por longos períodos. O uso de esterco não tratado nas lavouras eleva o risco de contaminação comparado com o esterco tratado, embora este não seja livre de microrganismos (MAGKOS *et al.*, 2003).

Muitos surtos têm sido associados ao consumo de frutas, legumes e verduras frescas. Alguns deles envolveram alface contaminada com patógenos como a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *E. coli* O157:H7. Os vegetais podem se contaminar durante o crescimento ou colheita, no período pós-colheita, na manipulação ou distribuição (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Segundo CDC, Estados Unidos, ocorreu um aumento no número de surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a vegetais entre 1995 e 2005 em todo o mundo. Vários surtos de salmonelose associados a alimentos de origem vegetal, consumidos *in natura* foram relatados nos Estados Unidos nos últimos anos, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Surtos envolvendo alimentos de origem vegetal contaminados por *Salmonella* ocorridos nos Estados Unidos\*

Alimento (sorovar)	Nº de infectados	Nº de hospitalizações	Nº de óbitos	Ano
Mamão ( <i>S. Agona</i> )	106	10	-	2011
Melão ( <i>S. Panama</i> )	20	3	-	2011
Brotos de alfafa ( <i>S. Enteritidis</i> )	25	3	-	2011
Manga ( <i>S. Braenderup</i> )	127	33	-	2012
Melão ( <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Newport</i> )	261	94	3	2012
Pepino ( <i>S. SaintPaul</i> )	84	17	-	2013

\* Dados obtidos do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Estados Unidos).

Autoridades de saúde da Alemanha, em 2011, notificaram um surto de diarreia sanguinolenta, com vários casos de Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU), no norte da Alemanha, em outros países da Europa, nos Estados Unidos e no Canadá. Até a última semana de junho de 2011 tinham sido notificados, em toda a Europa, mais de 4 mil casos de diarreia relacionados à *E. coli* O104:H4, com aproximadamente 900 casos de síndrome hemolítico-urêmica e 48 óbitos. Segundo os estudos epidemiológicos, a fonte primária de transmissão foram brotos de alfafa produzidos no norte da Alemanha (CVE, 2011).

Vários surtos envolvendo alface têm sido reportados nos últimos anos. Como a alface é um produto que é consumido fresco, apresenta risco potencial de transmissão de bactérias patogênicas a partir do esterco (JOHANNSEN *et al.*, 2004).

### **3.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. E *E. COLI***

Os métodos tradicionais para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos levam até cinco dias para obtenção dos resultados e por serem demorados e trabalhosos são um problema para a indústria alimentícia (RATHNAYAKA e RAKSHIT, 2010). As técnicas convencionais de cultura envolvem etapas de enriquecimento não seletivo, seguidas de enriquecimento seletivo, isolamento em meios solidificados seletivos e diferenciais e confirmação bioquímica e sorológica das colônias suspeitas (HEIN *et al.*, 2006, ALVES *et al.*, 2012).

Para a identificação de *Salmonella* spp. em alimentos é recomendado o pré-enriquecimento em meio de cultura adequado ao tipo de matriz alimentar (como por exemplo, água peptonada tamponada, caldo lactose, caldo tripton de soja com ou sem sulfato ferroso, caldo nutriente, caldo universal pré-enriquecimento com ou sem sulfato férrico amoniacal) (BAM, 2014), seguido por enriquecimento seletivo em caldos Rappaport-Vassiliadis (RV), Tetrionato (TT) ou Selenito-Cistina (SC). Posteriormente, alíquotas do enriquecimento são semeadas em meios seletivos e diferenciais, tais como, ágar Hektoen (HE), ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) e ágar Bismuto Sulfito (BS). As colônias suspeitas são submetidas à triagem bioquímica e, para confirmação de *Salmonella* spp., é

realizado sorologia com anti-soros polivalentes somático e flagelar. A identificação do sorovar é realizada somente por laboratórios credenciados ou de referência (SILVA *et al.*, 2007).

O método clássico de contagem de coliformes totais, coliformes a 45 °C e *E. coli* em alimentos é o Número Mais Provável (NMP), que consiste em inocular alíquotas de 1 mL de diferentes diluições em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ou Caldo Lactose (CL) com tubos de Durham invertidos e incubação a 35 °C por 24 a 48 h. Os tubos com crescimento e produção de gás são semeados em tubos contendo Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB) com tubos de Durham invertidos e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Os tubos CLBVB com crescimento e gás são repicados para tubos contendo caldo EC com tubos de Durham invertidos e incubados a 45 °C por 24 a 48 h. A formação de gás nos tubos de CLBVB e caldo EC indica a presença de coliformes totais e coliformes a 45 °C, respectivamente, sendo o resultado expresso em NMP por grama de alimento. Para contagem de *E. coli*, os tubos de EC com gás são repicados para placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno-EMB e incubadas a 35 °C. Após 24 h, colônias negras com ou sem brilho metálico, suspeitas de *E. coli*, são identificadas bioquimicamente. As placas de EMB positivas para *E. coli*, correspondentes aos tubos de EC positivos com gás, são consideradas para o cálculo de *E. coli* por grama de alimento (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

O uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção de microrganismos patogênicos em alimentos é uma alternativa que apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como rapidez, sensibilidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias de difícil cultivo.

Ensaio PCR para detecção de *Salmonella* em alimentos otimizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (ALVES *et al.*, 2012), foi testado para detecção dessa bactéria patogênica em alfaces crespas produzidas pelo sistema convencional e orgânico.

O método consiste, basicamente, na utilização de oligonucleotídeos iniciadores e da enzima DNA polimerase para sintetizar *in vitro* sequências do DNA. O ensaio é realizado em três etapas (desnaturação, hibridação dos iniciadores e

polimerização da sequência alvo), que se repetem de 30 a 40 vezes, gerando  $2^n$  cópias da região de interesse do DNA, onde n é igual ao número de ciclos da reação (GARCIA; MA, 2005; GANDRA *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2012).

Vários ensaios PCR e PCR multiplex já foram padronizados para detecção de bactérias patogênicas em alimentos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL (CASARIL, 2010; SILVA *et al.*, 2011; ALVES *et al.* 2012; SAEKI *et al.*, 2013; BENETTI, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA CONVENCIONAL E ORGÂNICO NA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ.

#### 4.1.1 Amostragem

As análises microbiológicas foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina – Paraná. As alfaces foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos de primeiro uso, colocadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao laboratório para o início das análises no mesmo dia.

As amostras de alface crespa foram coletadas em dias distintos e de maneira aleatória em quatro propriedades rurais diferentes. Três eram produtoras de alfaces pelo sistema convencional, denominadas A, B e C, e uma era produtora orgânica, denominada D. A tabela 3 mostra as principais características das propriedades estudadas.

Tabela 3 – Principais características das propriedades rurais estudadas

Propriedade	Sistema de produção	Produção mensal de unidades de hortaliças	Origem da água de irrigação	Produção de outras hortaliças	Tipo de adubação
A	Convencional	9 mil	Nascente	Sim <sup>1</sup>	Química
B	Convencional	5 mil	Rio	Sim <sup>2</sup>	Química
C	Convencional	450	Rio	Sim <sup>3</sup>	Orgânica <sup>5</sup>
D	Orgânico	450	Nascente	Sim <sup>4</sup>	Orgânica <sup>6</sup>

<sup>1</sup> alface americana.

<sup>2</sup> alface roxa, americana, lisa, almeirão.

<sup>3</sup> alface americana, rúcula, couve flor, repolho.

<sup>4</sup> alface americana, rúcula, salsa, cebolinha.

<sup>5</sup> Cama de frango.

<sup>6</sup> Adubo compostado.

**Fonte:** o próprio autor

Um total de 111 amostras foram analisadas, sendo 71 de amostras de alfaces crespas convencionais e 40 amostras de alfaces crespas orgânicas. Foram coletadas amostras de um mesmo lote antes e após a lavagem para comercialização, sem nenhuma interferência no procedimento utilizado na rotina das propriedades. Na tabela 4 está apresentado o número total de amostras coletadas em cada propriedade, o número de lotes analisados e o número de amostras analisados em cada lote.

Tabela 4 – Número de amostras de alface coletadas em cada propriedade e número de amostras de cada lote coletadas antes e após o processo de higienização.

Propriedade rural	Nº amostras(n=111)	Não Higienizadas*	Higienizadas*
A	30	1º lote – 5 unidades	1º lote – 5 unidades
		2º lote – 5 unidades	2º lote – 5 unidades
		3º lote – 5 unidades	3º lote – 5 unidades
B	19	1º lote – 9 unidades	1º lote – 10 unidades
C	22	1º lote – 5 unidades	1º lote – 5 unidades
		2º lote – 6 unidades	2º lote – 6 unidades
D	40	1º lote – 5 unidades	1º lote – 5 unidades
		2º lote – 5 unidades	2º lote – 5 unidades
		3º lote – 10 unidades	3º lote – 10 unidades

Fonte: o próprio autor

#### 4.1.2 Análise microbiológica para detecção de *E. coli* e de *Salmonella* spp. em alfaces orgânicas e convencionais

Alíquotas de 25 g das amostras de alfaces foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada alcalina. Para a pesquisa de coliformes totais e a 45 °C empregou-se o método do Número Mais Provável (NMP). A partir da água de enxágue, foram realizadas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> em água peptonada tamponada (Becton, Dickinson and Company). Alíquotas de 1 mL de cada diluição

foram inoculadas em tubos contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, Michigan) com tubos de Durhan invertidos e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Após esse período de incubação, 0,1 mL de cada tubo que apresentou crescimento e produção de gás foi transferido para tubos contendo caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB) (Himedia, Mumbai, Índia) e Caldo EC (Himedia, Mumbai, Índia) com tubos de Durhan invertidos e incubados a 35 °C por 24 a 48 h e 45 °C por 24 a 48 h, respectivamente. A formação de gás nos tubos de CLBVB indica a presença de coliformes totais e nos tubos de EC indica a presença de coliformes a 45 °C. O resultado foi expresso em NMP de coliformes totais e ou a 45 °C por grama de alimentos. Para verificar a presença de *E. coli*, os tubos de E.C. com gás foram repicados para placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno-EMB (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 35 °C. Após 24 h, colônias negras com ou sem brilho metálico, suspeitas de *E. coli*, foram identificadas bioquimicamente utilizando as provas bioquímicas de citrato de *Simmons* (Himedia, Mumbai, Índia), indol (Becton, Dickinson and Company) e Tríplice Açúcar Ferro (Himedia, Mumbai, Índia). As placas de EMB positivas para *E. coli*, correspondentes aos tubos de EC positivos com gás, foram consideradas para o cálculo de *E. coli* por grama de alimento (SILVA et al., 2007).

Para pesquisa de *Salmonella* spp., a água de enxágue das alfaces foi incubada a 35 °C por 24 h. Alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL do enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo tetracionato (TT) (Becton, Dickinson and Company) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Becton, Dickinson and Company). O caldo TT foi incubado a 37 °C por 24 h e o caldo RV a 42 °C por 48 h. Os meios de Hektoen (Becton, Dickinson and Company) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) (Becton, Dickinson and Company) foram utilizados como meios seletivos e diferenciais, incubados a 37 °C por 24 h. Colônias características de *Salmonella* spp. foram submetidas a triagem bioquímica com as provas de descarboxilação da lisina, hidrólise da uréia, motilidade e produção de indol. A confirmação do gênero foi realizada através da técnica de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Becton, Dickinson and Company).

## 4.2 ENSAIO PCR PARA PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP. EM ALFACES ORGÂNICAS E CONVENCIONAIS

### 4.2.1 Extração de DNA

Alíquotas de 1 mL do enriquecimento não seletivo preparado conforme item 4.1.2, foram centrifugadas a 16000 x *g* por 10 min a temperatura ambiente (TA). O precipitado foi lavado com 1 mL de água peptonada a 1% esterilizada (Becton, Dickinson and Company), centrifugado por 10 min a 16000 x *g* (TA) e ressuspenso com 200 µL de solução de lise TZ (2% Triton X-100, 2,5 mg azida sódica em 0,1M tampão Tris-HCl a pH 8,0) (ALBOLMAATY *et al.*, 2000). As suspensões foram fervidas a 100 °C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min, centrifugadas por 5 min a 14000 x *g* (TA) e o sobrenadante foi utilizado como DNA alvo para a PCR.

### 4.2.2 PCR para detecção de *Salmonella* spp.

Para a identificação do gênero *Salmonella* spp. foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador Styinva-JHO-2, que amplifica uma região do gene *invA* (tabela 5).

Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de *Salmonella* spp. no ensaio PCR.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5'- 3')	Produto amplificado (pb*)	Referência
Styinva-JHO-2	Right AAACGTTGAAAACTGAGGA Left TCGTCATTCCATTACCTACC	119	HOO FAR et al., 2000

\* pb: pares de base

A PCR foi realizada com 0,5 µM dos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right (IDT – Integrated DNA Technologies Prodímol, Belo Horizonte, Brasil). O volume final da reação foi de 20 µL, contendo 5 µL de DNA, 2 µL de tampão para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 50 mM KCl) (Invitrogen, Brasil,

São Paulo, SP, Brasil), 5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 6 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA) e 1,0 U Taq Polimerase (Invitrogen).

As condições de amplificação empregadas no termociclador (TC-412) (Techne Ltda., Duxford, Cambridge, Inglaterra) foram de desnaturação inicial de 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, hibridação dos iniciadores a 60 °C por 30 s, polimerização da sequência alvo de 72 °C por 45 s e polimerização da sequência alvo final de 5 min a 72 °C.

#### **4.2.3 Análise dos produtos de amplificação**

Após a amplificação foram adicionados 3 µL de tampão de amostra [Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wisconsin, EUA) 15%; azul de bromofenol (Synth) 0,25%]. Aliquotas de 10 µL dessa mistura foram analisadas em gel de agarose (BioAmerica, Miami, FL, USA) a 1,5% acrescidos de 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO (Invitrogen).

A eletroforese foi realizada a 80 V por 50 min, em cuba horizontal com tampão Tris borato EDTA [Tris (Invitrogen) 45 mM; ácido bórico (Nuclear) 45 mM, EDTA (Nuclear) 1,25 mM]. Como marcador de massa molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz UV em transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia Molecular, Cotia, São Paulo, Brasil). O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação L.Pix Image Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia Molecular).

### **4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO MICROBIOLÓGICO DA ÁGUA UTILIZADA PARA IRRIGAÇÃO DAS ALFACES CRESPAS CONVENCIONAIS E ORGÂNICAS**

#### **4.3.1. Coleta das amostras da água para irrigação**

Um total de 8 amostras de água para irrigação foram coletadas nas diferentes propriedades rurais estudadas. Cada amostra foi coletada no mesmo dia em que foram coletadas as amostras de alface. A fonte de água utilizada para irrigação em cada propriedade está descrita na tabela 2.

As amostras de água para irrigação nas propriedades rurais estudadas foram coletadas em frascos de vidro estéreis, de 250 mL, e transportadas até o Laboratório de Bacteriologia (Departamento de Microbiologia, CCB, UEL/Londrina), mantidas a 4 °C até o início da análise.

#### **4.3.2 Análise microbiológica das amostras pela técnica do Colilert®**

A técnica utilizada para detecção e quantificação de coliformes totais e de *E. coli* foi a do substrato cromogênico Colilert (SOVEREIGN – USA), aprovado pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AMERICAN PUBLIC ASSOCIATION, 2004), pela Portaria do Ministério da Saúde nº. 2.914 (BRASIL, 2011) e descrita por Chao (2006).

O Colilert utiliza tecnologia de substrato (triptose, ONPG e MUG) para detecção de coliformes totais e *E. coli* em água. Os coliformes totais apresentam a enzima  $\beta$ -galactosidase, que degrada o substrato o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) produzindo ortonitrofenol, de coloração amarela. *E. coli* também possui a enzima  $\beta$ -glucuronidase, que degrada o substrato 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucuronídeo (MUG), formando 4-metil-umbeliferona que apresenta fluorescência azul sob luz ultravioleta (365 nm).

As amostras foram analisadas segundo o preconizado pelo fabricante e descrita a seguir. Em um frasco estéril, contendo 100 mL da amostra de água a ser analisada foi acrescentada, assepticamente, uma ampola do substrato. Após homogeneização, a mistura foi transferida para a cartela Quanti-Tray (WP2000) com 49 poços grandes e 48 pequenos. A cartela foi selada, utilizando a seladora Quanti Tray Sealer (IDEXX/SOVEREIGN - USA), e incubada a 35 °C por 24 h. Após o período de incubação, foi realizada a leitura dos poços e aqueles com coloração amarela foram considerados positivos para coliformes totais. Para verificar a presença de *E. coli*, as cartelas foram colocadas sob luz ultravioleta e os poços amarelos que apresentaram-se azul-fluorescentes indicavam a presença de *E. coli*. A contagem em número mais provável por 100 mililitros de água (NMP/100 mL) foi obtida através de uma tabela fornecida pelo fabricante.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA CONVENCIONAL

As contagens de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de *E. coli* obtidas após a avaliação de alfaces higienizadas e não higienizadas produzidas em três diferentes propriedades rurais pelo sistema convencional estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 – Contagens de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de *E. coli* obtidas em amostras de alfaces cresas produzidas em três propriedades rurais pelo sistema convencional.

Propriedade	Lotes Avaliados*	Contagem por NMP/g					
		Alfaces não higienizadas			Alfaces higienizadas		
		Coliformes totais	Coliformes a 45 °C	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	Coliformes a 45 °C	<i>E. coli</i>
A	1	≥ 2400	<3	NI	240	<3	NI
		460	<3	NI	93	9	9
		240	<3	NI	43	4	4
		43	<3	NI	43	<3	NI
		43	<3	NI	23	<3	NI
	2	≥ 2400	93	4	≥ 2400	1100	1100
		460	93	23	43	3	NI
		460	15	9	43	<3	NI
		93	23	23	43	<3	NI
		39	4	4	9	4	4
	3	**≥ 2400	43	15	≥ 2400	21	14
		≥ 2400	7	3	≥ 2400	<3	NI
		≥ 2400	23	14	≥ 2400	4	NI
		≥ 2400	14	14	≥ 2400	7	3
		21	<3	<3	120	14	11
B	1	1100	<3	NI	≥ 2400	<3	NI
		460	<3	NI	240	<3	NI
		460	<3	NI	240	<3	NI
		150	<3	NI	23	<3	NI
		15	<3	NI	4	<3	NI
		≥ 2400	11	NI	≥ 2400	4	NI
		≥ 2400	4	NI	≥ 2400	<3	NI
		≥ 2400	4	NI	≥ 2400	<3	NI
		≥ 2400	<3	NI	≥ 2400	<3	NI
C	1	150	150	150	23	<3	NI
		23	9	9	23	<3	NI
		23	4	4	9	<3	NI
		23	4	NI	7	<3	NI
		4	4	4	<3	<3	NI
	2	≥ 2400	<3	NI	23	<3	NI
		9	<3	NI	23	<3	NI
		4	<3	NI	4	<3	NI
		4	<3	NI	3	<3	NI
		3	<3	NI	3	<3	NI
3	<3	NI	3	<3	NI		

<sup>NI</sup> Não isolado

\* Os diferentes lotes foram compostos por pés de alface coletados em dias diferentes.

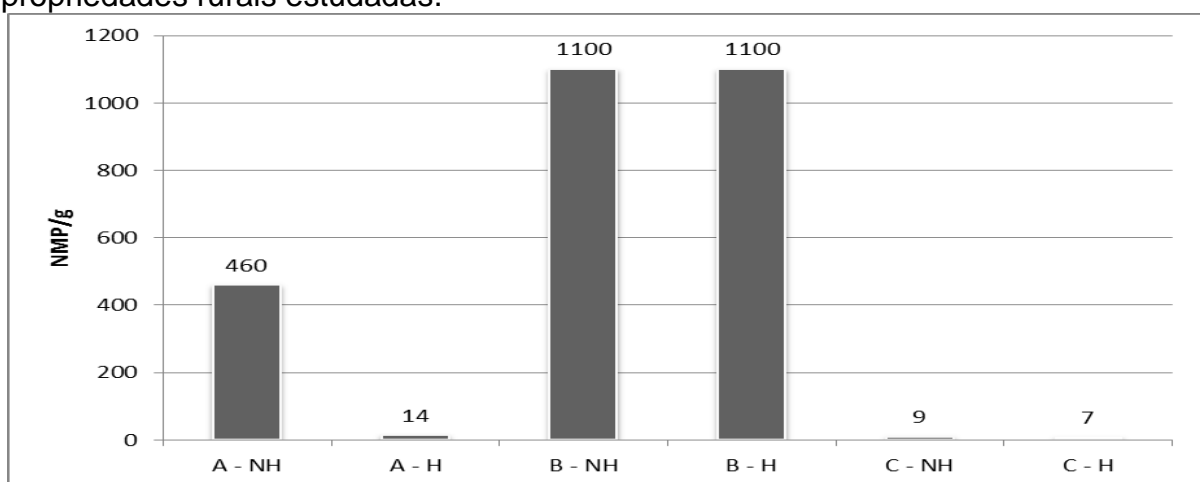
\*\* Presença de *Salmonella* spp. em uma amostra do lote 3 da propriedade A.

Fonte: o próprio autor

A presença em alimentos de coliformes a 45 °C tem sido associado à contaminação por fezes. *Enterobacter* spp. e *Klebsiela* spp., que pertencem a este grupo, podem ser isolados a partir do trato gastrointestinal de animais e humanos, mas em menor proporção que a *E. coli*, e portanto, apresentam menor importância como indicadores da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. *E. coli* tem como reservatório natural o intestino humano e de animais, e portanto, é o indicador mais apropriado para contaminação fecal em alimentos (JOHANNSEN, LONCAVERIC e KRUSE, 2002; SILVA, CAVALLI e OLIVEIRA, 2006).

As medianas das contagens de coliformes totais dos lotes analisados antes da higienização, obtidas nas propriedades rurais A e B, foram  $4,6 \times 10^2$  NMP/g e  $1,1 \times 10^3$  NMP/g, respectivamente, ambas superiores quando comparadas com a propriedade C (9 NMP/g) (figura 1). A explicação para esse resultado pode ser a diferença na produção diária entre as três propriedades estudadas. A propriedade C é de um pequeno produtor, com colheitas realizadas uma vez por semana pela esposa do produtor. O cuidado na retirada das alfaces do canteiro da horta na propriedade C, favorece a não contaminação dos pés de alface com o solo, o que justifica a menor contagem de coliformes, na maioria das amostras, mesmo antes da higienização.

Figura 1 – Gráfico das medianas das contagens de coliformes totais obtidas dos lotes de alfaces crespas não higienizadas e higienizadas coletadas nas diferentes propriedades rurais estudadas.



**A – NH:** Alfaces crespas não higienizadas obtidas na propriedade A. **A – H:** Alfaces crespas higienizadas obtidas na propriedade A. **B – NH:** Alfaces crespas não higienizadas obtidas na propriedade B. **B – H:** Alfaces crespas higienizadas obtidas na propriedade B. **C – NH:** Alfaces crespas não higienizadas obtidas na propriedade C. **C – H:** Alfaces crespas higienizadas obtidas na propriedade C.

**Fonte:** o próprio autor

As propriedades A e B têm uma produção mensal de 9 mil e 5 mil pés de alface, respectivamente, e realizam a colheita de alface todos os dias. Utilizam mão-de-obra composta por vários funcionários, além de produzir outras variedades de hortaliças, que também são colhidas em paralelo. Na propriedade A, apesar da grande produção diária, a higienização é realizada em uma área específica para esta finalidade. Utiliza água potável para a lavagem das alfaces, o que possibilitou a adequada limpeza da maioria das amostras, que foi comprovada pelos resultados obtidos após a higienização.

A propriedade B possui uma precária área para a higienização, sem nenhum protocolo de lavagem das alfaces, o que explica as contagens de coliformes totais e a 45 °C não uniformes. Algumas amostras tiveram a mesma contagem antes e após a higienização e outras, contagens maiores após a higienização.

Embora a contagem de coliformes totais na maioria das amostras coletadas na propriedade B, antes e após a higienização, estivesse acima de  $2,4 \times 10^3$  NMP/g, em nenhuma a contagem de coliformes a 45 °C ultrapassou a contagem máxima de  $10^2$  NMP/g estabelecida pela RDC nº 12, de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), para hortaliças *in natura*. A ausência de coliformes a 45 °C nessas amostras, pode ser explicada pelo fato do maior uso de agrotóxicos e fertilizantes, para manter a produção estável ao longo do ano, realizada nesta propriedade. Segundo Guan et al. (2005) alguns pesticidas aplicados em hortas podem ter efeitos inibitórios sobre patógenos. Nesse estudo, a habilidade de *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *Shigella* de sobreviver ou se multiplicar na presença de sete pesticidas diferentes utilizados por horticultores foi avaliada. Quatro dos agrotóxicos testados foram inibitórios para esses patógenos. Em um outro estudo realizado pelos mesmos pesquisadores, dos 15 pesticidas testados, 11 tiveram efeitos inibitórios sobre esses patógenos de origem alimentar (GUAN et al., 2001; GUAN et al, 2005).

As contagens de coliformes a 45 °C estavam acima do permitido pela legislação brasileira em 2,8 % das amostras de alfaces produzidas pelo sistema convencional (n = 71). Uma amostra obtida na propriedade C e coletada antes do processo de higienização apresentou contagem de  $1,5 \times 10^2$  NMP/g para coliformes a 45 °C e *E. coli*. Como se tratava de uma amostra sem higienização, a lavagem adequada, realizada antes da comercialização, pode reduzir a contaminação microbiana. A outra amostra, que excedeu o limite estabelecido pela RDC nº 12, foi coletada no produtor A e apresentou contagem de  $1,1 \times 10^3$  NMP/g para coliformes a

45 °C e *E. coli*. Apesar de ter sido classificada como higienizada, provavelmente o processo de lavagem desta amostra não foi executado, pois, dentre as 30 amostras obtidas deste produtor, apenas esta amostra apresentou contagem de coliformes a 45 °C, acima do estabelecido pela legislação.

Outro trabalho realizado com 26 amostras de hortaliças convencionais comercializadas em feiras livres de Londrina, PR, também não relatou a presença de *E. coli*, apesar de 26,9 % (n = 7) das amostras apresentarem contagem para coliformes a 45 °C acima do preconizado pela legislação brasileira (SILVA *et al.*, 2006). Johannssen *et al.* (2002) analisaram 200 amostras de alfaces obtidas em supermercados da Noruega e apenas cinco (0,6 %) amostras estavam contaminadas por *E. coli* (JOHANNSEN *et al.*, 2002).

Outros trabalhos realizados no Brasil também avaliaram as condições higiênico-sanitárias de produção de hortaliças. Os resultados, no entanto, foram muito diferentes dos obtidos no presente trabalho. Takayanagui *et al.* (2001) constataram que 67 % (n= 115) dos pontos de venda de Ribeirão Preto, SP, comercializavam hortaliças com contagens de coliformes a 45 °C acima do permitido pela legislação brasileira. Gomes Neto *et al.* (2012) observaram também elevadas contagens de coliformes a 45 °C em 66 % das alfaces produzidas pelo sistema convencional (n = 20).

No presente estudo uma amostra (1,3 %) de um lote de alface convencional coletada antes do processo de higienização na propriedade A estava contaminada com *Salmonella* spp. e, portanto, em desconformidade com a legislação brasileira. Como este resultado refere-se à uma amostra sem higienização, a lavagem adequada realizada antes do envio destes produtos aos estabelecimentos comerciais poderia reduzir a contaminação microbiana. *Salmonella* spp. foi isolada da amostra de alface convencional tanto pelo método tradicional de cultura quanto pela técnica de PCR.

Oliveira *et al.* (2011) avaliaram a qualidade higiênico-sanitária de folhosas minimamente processadas (alface, rúcula, chicória selvagem, repolho, entre outros), comercializadas em supermercados de Ribeirão Preto, SP. Das 162 amostras analisadas, 1,2 % (duas amostras de chicória selvagem) estavam contaminadas por *Salmonella* spp. Outro estudo realizado em São Paulo (SP) também avaliaram 152 embalagens de folhosas minimamente processadas e em uma delas (0,4 %) foi isolado *Salmonella* Typhimurium (SANT'ANA *et al.*, 2011).

Takayanagui et al. (2001) constataram que 9 % de amostras analisadas, coletadas em diferentes pontos de venda de Ribeirão Preto, SP, estavam contaminadas por *Salmonella* spp.

## 5.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA ORGÂNICO

As contagens de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de *E. coli* obtidas nas amostras de alfaces cresas analisadas neste trabalho, produzidas na propriedade D (produção orgânica), estão representadas da tabela 7.

Tabela 7 – Contagens de coliformes totais, de coliformes a 45 °C e de *E. coli* obtidas em amostras de alfaces cresas produzidas na propriedade de produção orgânica.

Propriedade	Lotes Avaliados*	Contagem por NMP/g					
		Alfaces não higienizadas			Alfaces higienizadas		
		Coliformes totais	Coliformes a 45 °C	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	Coliformes a 45 °C	<i>E. coli</i>
D	1	1100	<3	NI	<3	<3	NI
		460	<3	NI	<3	<3	NI
		93	4	NI	<3	<3	NI
		28	9	NI	<3	<3	NI
		9	<3	NI	<3	<3	NI
	2	460	<3	NI	43	<3	NI
		93	<3	NI	15	<3	NI
		39	<3	NI	<3	<3	NI
		4	<3	NI	<3	<3	NI
		<3	<3	NI	<3	<3	NI
	3	≥ 2400	1100	1100	≥ 2400	≥ 2400	28
		≥2400	210	3	≥ 2400	460	7
		≥2400	14	14	≥ 2400	<3	NI
		≥2400	4	NI	460	150	28
		460	43	NI	460	<3	NI
		460	11	NI	23	<3	NI
		240	23	23	23	4	4
		93	43	15	15	<3	NI
		43	15	4	11	<3	NI
		21	<3	NI	<3	<3	NI

NI Não isolado; \* Os diferentes lotes foram compostos por pés de alface coletados em dias diferentes.

Fonte: o próprio autor

As contagens de coliformes a 45 °C estavam acima do permitido pela legislação brasileira, em 12,5 % das amostras de alfaces crespas produzidas pelo sistema orgânico (5/40), sendo que duas foram coletadas antes e três após o processo de higienização, e todas eram referentes ao lote 3. Assim sendo, é importante avaliar os resultados obtidos nos lotes 1 e 2 separadamente daqueles obtidos no lote 3, porque o produtor durante o período de amostragem teve dificuldades em manter as boas práticas de produção orgânica. É interessante observar que quando essas práticas, exigidas pela certificadora, foram aplicadas as amostras analisadas (lotes 1 e 2) apresentaram boas condições higiênico-sanitárias e uniformidade nos resultados. Por outro lado, problemas enfrentados pelo produtor impossibilitaram a execução dos procedimentos padronizados pela certificadora, o que levou ao abandono dos canteiros da horta, que somado ao uso de adubo orgânico compostado, podem ter causado o aumento da contaminação das alfaces do lote 3.

As contagens de coliformes a 45 °C e *E. coli* das três amostras coletadas após a higienização acima do limite preconizado pela legislação, evidenciou que o não cumprimento do protocolo de lavagem estabelecido pela certificadora também pode ter corroborado com as maiores contagens obtidas nessas amostras.

Rodrigues *et al.* (2014) avaliaram a qualidade das alfaces orgânicas no Rio Grande do Sul. Os lotes de alfaces não higienizadas apresentaram contagens de *E. coli* acima do permitido pela legislação brasileira, no entanto, todas as amostras dos lotes de alfaces higienizadas apresentaram contagens inferiores a 10 UFC/g de *E. coli*, o que reforça a importância da etapa de lavagem das alfaces.

Mukherjee *et al.* (2004) avaliaram 32 produtores orgânicos, sendo 8 deles certificados e 24 não certificados. As alfaces produzidas pelos produtores certificados não apresentaram contaminação por *E. coli*, no entanto, 30 % (n = 12) das amostras coletadas em propriedades não certificadas estavam contaminadas por essa bactéria, o que reforça a importância de cumprir as exigências estabelecidas pelas certificadoras.

Loncaveric *et al.* (2005) isolaram *E. coli* em 16 (89 %) das 179 amostras de alfaces orgânicas analisadas e coletadas em propriedades rurais na Noruega, porém a contagem excedeu a 10<sup>2</sup> UFC/g em quatro amostras (2,2 %). Santos *et al.* (2010) também obtiveram contagens para coliformes a 45 °C acima de

10<sup>2</sup> NMP/g em alfaces produzidas pelos sistemas de produção orgânica, convencional e hidropônica comercializadas no município de Botucatu, SP.

Um estudo realizado com alfaces orgânicas por Gomes Neto *et al.* (2012), em João Pessoa, PB, encontrou 80 % das amostras analisadas com contagens de coliformes a 45 °C acima do permitido pela legislação brasileira, e também encontraram diferentes enteroparasitas, tais como *Entamoeba histolytica*, *Giardia* spp., *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis*, o que indicou condições higiênico-sanitárias de produção bastante precárias. Condições muito específicas são exigidas para certificação da produção orgânica e os resultados de Gomes Neto (2012) surpreendem porque indicam total falta de controle e cumprimento das diferentes etapas exigidas pelas certificadoras.

Não foi isolado *Salmonella* spp. nas amostras de alfaces orgânicas analisadas neste trabalho. Outros estudos, que avaliaram a contaminação microbiológica de alfaces produzidas pelos sistemas orgânico, convencional e hidropônico, também não detectaram *Salmonella* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; GOMES NETO *et al.*, 2012). Por outro lado, Arbos *et al.* (2010) analisaram alface, cenoura e tomate em treze propriedades orgânicas credenciadas na região metropolitana de Curitiba, PR. As condições higiênico-sanitárias das amostras de alface e cenoura foram inferiores às amostras de tomate analisadas, uma vez que as amostras de alface e cenoura apresentaram contagens de coliformes a 45 °C superiores ao permitido pela legislação brasileira, bem como a presença de *Salmonella* spp. e de estruturas parasitárias (ARBOS *et al.*, 2010).

Estudos mostraram que é possível ocorrer a internalização do patógeno nas folhas do alface, pois bactérias patogênicas como a *E. coli* podem sobreviver durante períodos longos no solo e na água, e através das raízes, se infiltrarem e se alojarem na parte comestível da planta, podendo resistir à sanitização (SOLOMON, YARON e MATTHEWS, 2002). Islam *et al.* (2004) demonstraram que a contaminação dos alimentos de origem vegetal podem ocorrer sem a necessidade de uma exposição prolongada a esses patógenos.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO MICROBIOLÓGICO DA ÁGUA UTILIZADA PARA IRRIGAÇÃO DAS ALFACES CRESPAS PRODUZIDAS PELO SISTEMA CONVENCIONAL E ORGÂNICO

A qualidade e a segurança de legumes e verduras depende do uso de água apropriada para irrigação e das boas práticas durante a colheita, o transporte, o armazenamento e a manipulação. Entretanto, fatores intrínsecos ao cultivo, como proximidade da planta ao solo e aplicação de adubo orgânico podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

É importante mencionar que a fonte de água utilizada para irrigação das alfaces nas propriedades estudadas não era a mesma empregada para o processo de higienização.

As contagens de coliformes totais e *E. coli* obtidas da água utilizada para a irrigação nas propriedades rurais avaliadas neste trabalho estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 – Contagem de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água para a irrigação coletadas nas diferentes propriedades rurais analisadas.

Propriedade	Lotes avaliados*	Coliformes totais (NMP/100mL)	<i>E. coli</i> (NMP/100 mL)
A	1	$1,41 \times 10^3$	$4,1 \times 10^0$
	2	$>2,41 \times 10^3$	$4,65 \times 10^1$
B	1	$>2,41 \times 10^3$	$2,24 \times 10^2$
C	1	$> 2,41 \times 10^3$	$4,88 \times 10^2$
	2	$> 2,41 \times 10^3$	$7,37 \times 10^2$
D	1	$1,98 \times 10^3$	$2,59 \times 10^1$
	2	$5,09 \times 10^2$	$2,0 \times 10^0$
	3	$2,41 \times 10^3$	$2,28 \times 10^2$

\* Os lotes avaliados são referentes às amostras de água coletadas nos mesmos dias em que os lotes de alfaces foram coletados.

Fonte: o próprio autor

A resolução n° 357 de março de 2005 da CONAMA, estabelece que as águas destinadas à irrigação de hortaliças não devem apresentar contagem superior a  $2,0 \times 10^2$  coliformes a 45 °C ou *E. coli* em 100 mililitros de água. Sendo assim, 4 (50 %) amostras de água para irrigação apresentaram contagem acima do permitido

pela legislação. Das quatro propriedades avaliadas neste trabalho, apenas a propriedade A, apresentou resultado satisfatório quanto ao padrão microbiológico das águas utilizadas para a irrigação (BRASIL, 2005).

A propriedade B teve contagem de *E. coli* um pouco acima do limite estabelecido pela resolução nº 357 para a água de irrigação, no entanto, parece não ter contribuído para a contaminação das alfaces crespas, as quais obtiveram contagens para coliformes a 45 °C e *E. coli* muito inferiores ao limite estabelecido pela RDC nº 12.

A propriedade C apresentou elevadas contagens de coliformes totais e *E. coli* na água, no entanto, as amostras de alfaces coletadas, tanto higienizadas quanto não higienizadas, apresentaram baixas contagens dessas bactérias, o que indica que a água de irrigação não interferiu na contaminação das amostras. Os resultados obtidos na propriedade D, referentes aos lotes 1 e 2, apresentaram contagens de *E. coli* de acordo com o preconizado pela legislação brasileira, no entanto, a contagem de *E. coli* obtida no lote 3 ultrapassou o limite estabelecido, o que, possivelmente, pode ter contribuído para o aumento da contaminação das alfaces coletadas antes e após a higienização.

Ceuppens *et al.* (2014) avaliaram a qualidade da água para irrigação utilizada em propriedades produtoras de alfaces tanto orgânicas quanto convencionais no Rio Grande do Sul e 60 % (N = 53) das amostras estavam contaminadas por *E. coli* e em desconformidade com a legislação brasileira. Esses autores, no entanto, consideraram a resolução nº 20, de 1986 da CONAMA, a qual estabelecia tolerância zero para *E. coli* em água para irrigação para hortaliças consumidas cruas. Como os autores não informaram quais foram as contagens obtidas, não foi possível saber se os 60 % das amostras de água estavam realmente em desacordo com o preconizado pela legislação vigente (resolução nº 357/2005). Por outro lado, Rodrigues *et al.* (2014) que também estudaram a contaminação presente na água para irrigação utilizada em diferentes propriedades orgânicas no Rio Grande do Sul, constataram que a contagem de *E. coli* estava abaixo do limite determinado pela legislação brasileira.

Resultados obtidos por Watchel *et al.* (2002) e Barker-reid *et al.* (2009) reforçam a necessidade da utilização de água apropriada para irrigação de frutas, legumes e verduras para a minimização dos riscos de contaminação por bactérias

patogênicas destes alimentos (WATCHEL; WHITEHAND; MANDRELL, 2002b; BARKER-REID *et al.*, 2009).

## 6 CONCLUSÃO

As contagens de coliformes a 45 °C estavam acima do permitido pela legislação brasileira, em 2,8 % das amostras de alfaces crespas produzidas pelo sistema convencional (2/71). Em uma amostra (1,3 %) de um lote de alface convencional coletada antes do processo de higienização foi isolado *Salmonella* spp. Em relação às alfaces crespas produzidas pelo sistema orgânico, 12,5 % (5/40) apresentaram contagens de coliformes a 45 °C acima do limite estabelecido pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001) e não foi isolado *Salmonella* spp.

A água utilizada para a irrigação das alfaces em duas das propriedades convencionais e na propriedade orgânica estudadas apresentaram resultados insatisfatórios ( $> 10^2$ NMP/ 100mL) quanto às contagens de *E. coli*.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as condições higiênico-sanitárias das alfaces analisadas, produzidas pelo sistema convencional, foram satisfatórias. Em relação aos resultados referentes às alfaces produzidas pelo sistema orgânico, é importante salientar que os produtos orgânicos precisam ser produzidos seguindo as boas práticas de produção exigidas pelas certificadoras, para atender às expectativas do consumidor quanto à segurança e benefício à saúde.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. O. et al. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 108-118, 2010.
- ALBOMAATY, A. GU, W.; WITKOWSKI, R.; LEVIN, R. E. Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. **Microbios**, v.101, p. 181-189, 2000.
- ALVES, J., MARQUES, V.V., PEREIRA, L.F.P., HIROOKA, E.Y., OLIVEIRA, T.C.R.M. de. Multiplex PCR for the detection of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in chicken meat. **Journal of Food Safety**, 2012.
- AMS. Agriculture Marketing Service. National Organic Program. **Federal Register**, v. 65, n. 49, Março, 2000.
- ANÔNIMO. Biobrazil Releases francal. Disponível em [http://www.biobrazilfair.com.br/modulos/include/modulo\\_popupRelease.asp?release\\_ID=1772&idioma=1](http://www.biobrazilfair.com.br/modulos/include/modulo_popupRelease.asp?release_ID=1772&idioma=1). Acesso em: 07.05.2014a.
- ANÔNIMO. Mercado de orgânicos deve crescer 30 % neste ano. Disponível em: <http://www.organicnet.com.br/2014/04/mercado-de-organicos-deve-crescer-30-neste-ano/>. Acesso em: 07.05.2014b.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th edition. Editado por Clesceri, I.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D. Washington, D. C, 2004.
- ARANDA, K.R.S., FABBRICOTTI, S.H., FAGUNDES-NETO, U., SCALETSKY, C.A., Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, p. 145-150, 2007.
- ARBOS, K. A.; FREITAS, R. J. S.; STERTZ, S. C.; CARVALHO, L. A. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p. 215-220, 2010.
- BARKER-REID, F.; HARAPAS, D.; ENGLEITNER, S.; KREIDI, S.; HOLMES, R.; FAGGIAN, R. Persistence of *Escherichia coli* on injured iceberg lettuce in the field, overhead irrigated with contaminated water. **Journal of Food Protection**, v.72, n. 3, p. 458 – 464, 2009.
- BAM. Bacteriological Analytical Methods. Chapter 5. *Salmonella*. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>. Acesso em: 6. Jul. 2014.

- BENETTI, T. M. **Avaliação de métodos genotípicos e fenotípicos de detecção, quantificação e identificação de *Campylobacter* em alimentos**. 2014. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- BENJAMIN, L. ATWILL, E.R., JAY-RUSSEL, M., COOLEY, M., CARYCHAO, D., GORSKI, L., MANDREL, R.E. Occurrence of generic *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast. **International Journal of Food Microbiology**, n. 165, p. 65-76, 2013.
- BERALDO, R.M. **Qualidade bacteriológica de águas de irrigação de hortas nos municípios de Araraquara, Boa Esperança do Sul e Ibitinga, SP**. 2010. 63p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, SP.
- BETTIOL, W., GHINI, R., GALVÃO, J.A.H., SILOTO, R.C. Organic and conventional tomato cropping systems. **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p. 253 – 259, 2004.
- BEUCHAT, L.R., RYU L.H. Produce handling and processing practices. **Emerging Infections Diseases**, v. 3, n. 4, p. 459 – 465, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, de 10 de janeiro de 2001.
- BRASIL. Congresso Nacional. Lei n. 10.831, de 23 de Dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da União, de 24 de Dezembro de 2003, p.8.
- BRASIL. Decreto n° 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Diário Oficial da União, de 28 de Dezembro de 2007, p. 2.
- BRASIL. Resolução n° 357, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, n° 053, de 18 de Março de 2005, p. 58 – 63.
- BRASIL. Resolução n° 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário oficial da União n° 3, de 4 de Janeiro de 2012, p.43.
- BRZUSZKIEWICZ, E.; THURMER, A.; SCHULDES, J.; LEIMBACH, A.; LIESEGANG, H.; MEYER; BOELTER, J. PETERSEN, H.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: entero-aggregative-haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology*, v. 193, p. 883 – 891.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. Cadeia Produtiva de Produtos Orgânicos. Série Agronegócios, **Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA**, v. 5, 2007.

BUCK, J.W.; WALCOTT, R.R.; BEUCHAT, L.R. Recent trends in microbiological safety of fruit and vegetables. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/microsafety.aspx>> . Acesso em 25.abr.2014.

CAMARGO FILHO, W. P.; CAMARGO, F. P.; CAMARGO, A. M. M. P.; ALVES, H. S. Algumas considerações sobre a construção da cadeia de produtos orgânicos. **Informações Econômicas**, v.34, n.2, p.55-69, 2004.

CASARIL, K. B. P. B. **Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em alimentos**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

CASTILLA, K. S. **Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de *Salmonella* Enteritidis utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em epidemiologia experimental e aplicada a zoonoses) – Faculdade de Medicina de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne Disease Outbreaks – United States, 2010. Disponível em <[http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli\\_o145/index.html](http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html)>. Acesso em: 23.abr.2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne Disease Outbreaks – United States, 2012. Disponível em <<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>>. Acesso em: 23.abr.2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of human *Salmonella* Agona infections linked to whole, fresh imported papayas. CDC, 2011a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/agona-papayas/index.html>>. Acesso em: 18 jul 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Investigation update: multistate outbreak of human *Salmonella* Enteritidis infections linked to alfalfa sprouts and spicy sprouts. 2011b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/sprouts-enteritidis0611/070611/index.html>> Acesso em: 18 jul 2012

CEUPPENS, S.; HESSEL, C. T.; RODRIGUES, R. Q.; BARTZ, S.; TONDO, E. C.; UYTENDAELE, M. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 67 – 76, 2014.

CHAO, W.L. Evaluation of Colilert-18 for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in tropical fresh water. **Letters Applied Microbiology**, n.42, p. 115 – 120, 2006.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71 – 87, 2012.

COSTA, M.B.B. **Adubação orgânica**. Nova síntese e novo caminho para agricultura. São Paulo, Ed. Cone, 1985.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Informe – NET DTA 2011 - Surto de síndrome hemolítico-urêmica associado à *Escherichia coli* O104:H4, na Alemanha, maio-junho de 2011. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/SHU11\\_ALERTA0507.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/SHU11_ALERTA0507.pdf) Acesso em: 20 jul 2012.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology**, 8, p. 28–34, 2005.

DOYLE, M.P., ERICKSON, M.C. Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce: an overview. **Journal of Applied Microbiology**, n. 105, p. 317 – 330, 2008.

DUNKLEY, K. D.; CALLAWAY, T. R.; CHALOVA, V. I.; McREYNOLDS, J. L.; HUME, M. E.; DUNKLEY, C. S.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J.; RICKEA, S. C. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, p. 26 – 35, 2009.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo. Ed. Atheneu, 2004.

FRANZ, E.; VAN DIEPENINGEN, A.D.; DE VOS, O.J.; VAN BRUGGEN, A.H.C. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* serovar Typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6165 – 6174, 2005.

FONSECA, M.F.A.C., BARBOSA, S.C.A., COLNAGO, N.F., SILVA, G.R.R. **Agricultura orgânica. Introdução às normas, regulamentos técnicos e critérios para acesso ao mercado dos produtos orgânicos no Brasil**. Manual técnico 19. Niterói – RJ. Panorama Rio Rural. 2009.

FREITAS, C.G. **Adaptação da técnica de PCR múltipla para a identificação de *Salmonella* spp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium por carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal**. 65f. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2008.

GAGLIARDI, J.V.; KARNIS, J.S. Leaching of *Escherichia coli* in diverse soils under various agricultural management practices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 877 – 883, 2000.

GALAN, J.E.; CURTISS III, R. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella* Typhimurium among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella* typhi are deficient for entry into mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 2091 – 2908, 1991.

GALAN, J.E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of the a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4338 – 4349, 1992.

GANDRA, E.A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109 – 118, 2008.

GARCIA, J.G.N.; MA, S-F. Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 (Suppl.), 2005.

GOMES NETO, N.J.; PESSOA, R.M.L.; QUEIROGA, I.M.B.N.; MAGNANI, M.; FREITAS, F.I.S.; SOUZA, E.L.; MACIEL, J.R. Bacterial counts and occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cooping systems in Brazil. **Food Control**, v. 28, p. 47 – 51, 2012.

GUAN, T. Y.; BLANK, G.; ISMOND, A.; VAN ACKER, R. Fate of foodborne bacterial pathogens in pesticides products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 503 – 512, 2001.

GUAN, T.T.Y; BLANK, G.; HOLLEY, R.A. Survival of pathogenic bacteria in pesticide solutions and on treated tomato plants. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 2, p. 296 – 304, 2005.

HAMERSCHMIDT, I. Panorama geral: os números da agricultura orgânica hoje destacando o Paraná, 2005. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trabiniberto.htm>>. Acesso em: 05 jul 2012.

HEIN, I., et al. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 538 – 547, 2006.

HINTERHOLZ, B.; RIBEIRO, V.M. Feira agroecológica: uma alternativa para comercialização de produtos oriundos da agricultura familiar orgânica no município de Medianeira – PR: O caso da AAFEMED. **Synergismus cyentifica**, v. 6, n. 1, 2011.

HOORFAR, J.; AHRENS, P.; RÅDSTRÖM, P. Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella* enterica. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3429-3435, 2000.

IFOAM – International Federation of Organic Agriculture Movements. The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2014. Disponível em: <<http://www.organic-world.net>> Acesso em: 01.05.2014.

ISLAM, M.; DOYLE, M. P.; PHATAK, S. C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Persistence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 7, p. 1365 – 1370, 2004.

JOHANNESSEN, G.S., LONCAREVIC, S., KRUSEB, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 199 - 204, 2002.

JOHANNESSEN, G.S., FRØSETH, R.B, SOLEMDAL, L., JARP, J., WASTESON, Y. RØRVIK, L.M. Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic Iceberg lettuce. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 787–794, 2004.

KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KOTTWITZ, L. B. M., et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 32, p. 9 – 15, 2010.

KOUBA, M. Quality of organic animal products. **Livestock Production Science**, v. 80, p. 33–40, 2003.

LEADER, B. T.; FRYE, K. G.; HU, J.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BOYLE, D. S. High-throughput molecular determination of *Salmonella* enterica serovars using multiplex PCR and capillary electrophoresis analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 5, 2009.

LIU, L. Organic Brasil 10 anos. Disponível em <http://www.organicbrasil.org/downloads/NewsBrasil7.pdf>. Acesso em: 07.05.2014.

LONCAVERIC, S.; JOHANNESSEN, G.S.; RØRVIK, L.M. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 186 – 189, 2005.

LOPES, J. T. **Salmonella spp na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de susceptibilidade microbiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrição de PFGE**. 2011. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MAFFEI, D.F., SILVEIRA, N.F.A., CATANOZI, M.P.L.M. Microbiology quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. **Food Control**, v. 29, p. 226 – 230, 2013.

MAGKOS, F.; ARVANITI, F.; ZAMPELAS, A. Putting the safety of organic food into perspective. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, n. 2, 2003.

MAGKOS F.; ARVANITI, F.; ZAMPELAS, A. Organic Food: Buying More Safety or Just Peace of Mind? A Critical Review of the Literature. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 23 – 56, 2006.

MALORNY, B.; HUEHN, S.; DIECKMANN, R.; KRAMER, N.; HELMUTH, R. Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 81 – 95, 2009.

MARCUS, S. L., BRUMELL, J.H., PFEIFER, C.G., FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 145 – 156, 2000.

MUKHERJEE, A.; SPEH, D.; DYCK, E.; DIEZ-GONZALEZ, F. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 894 – 900, 2004.

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

MARQUELLI, W.A., SILVA, H.R. Aspectos sanitários da água para fins de irrigação. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças** 5. Maio, 1998.

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

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

OLIVEIRA, M.A., SOUZA, V.M., BERGAMINI, A.M.M., MARTINIS, E.C.P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 1400 – 1403, 2011.

PATON, A.W., PATON, J.C. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111 and rfbO157. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598 – 602, 1998.

PELL, A.N. Manure and microbes: Public and animal health problem? **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2673-2681, 1997.

RAHN, K., DE GRANDIS, S. A., CLARKE, R. C., MCEWEN, S. A., GALIN, J. E., GINOCCHIO, C., CURTISS III, C., GYLES, C.L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by Polymerase Chain Reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 271 – 279, 1992.

RATHNAYAKA, U.S.K., RAKSHIT, S.K. Evaluation of metal hydroxide immobilization and DNA extraction methods on detection of *Salmonella enterica* from pork sausage by nested polymerase chain reaction. **Journal of Muscle Foods**, v. 21, p. 801 – 812, 2010.

RIVERA, F. P.; et al. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from peruvian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3198 – 3203, 2010.

RIYAZ-UI-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 333 – 339, 2004.

RODRIGUES, J.F. **Diversividade genética do óperon *etx* em amostras de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC): determinação da variabilidade das sequências gênicas e capacidade de síntese da toxina termo-lábil (LT)**. 2009. Tese de doutorado (microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, R. Q.; LOIKOA, M. R.; PAULA, C. M. D.; HESSEL, C. T.; JACXSENS, L.; UYTENDAELE, M.; BENDER, R. J.; TONDO, E. C. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 152 – 164, 2014.

SAEKI, E. K. ; ALVES, J. ; BONFANTE, R. C. ; HIROOKA, E. Y. ; OLIVEIRA, T. C. R. M. Multiplex pcr (mPCR) for the detection of *Salmonella* spp. and the differentiation of the Typhimurium and Enteritidis serovars in chicken meat. **Journal of Food Safety**, v. 33, p. 25 – 29, 2013.

SALYERS, A. A., WHITT, D. D. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains. In: SALYERS, A.A., WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: A molecular approach**. 2ª edição. Washington, D.C. ASM Press. 2002, p. 407 – 418.

SANT'ANA, A.S., LANDGRAF, M., DESTRO, M.T., FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 8, p. 1235 – 1237, 2011.

SANTOS, C.M.G.; BRAGA, C.L.; VIEIRA, M.R.S.; CERQUEIRA, R.C.; BRAUER, R.L.; LIMA, G. P. P. Qualidade da alface comercializada no município de Botucatu - SP. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 11, n. 1, p. 67-74, 2010.

SEOW, J.; ÁGOSTON, R.; PHUA, L.; YUK, H. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. **Food Control**, v. 25, p. 39 – 44, 2012.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P. LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated

subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2959 – 2965, 2004.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45 °C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352 – 359, 2006.

SILVA, N. da et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo, SP: Varela, 2007. 536 p.

SILVA, Daniel Santos Pinto ; OLIVEIRA, T. C. R. M. ; Canato, T. ; Magnani, M ; ALVES. J. ; HIROOKA, E. Y. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1502 – 1507, 2011.

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

SOLOMON, E. B.; YARON, S.; MATTHEWS, K. R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 397 – 400, 2002.

SOUZA, J.L.; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa – MG, Ed. Aprenda Fácil, 2ª edição, 2006.

STELLA, A. E. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil**. 2009. 85f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal.

SU, L.H.; CHIU, C.H. Salmonella: Clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, v. 30, n.3, p. 210-219, 2007.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2011. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf)>. Acesso 18 jul 2012.

TAKAYANAGUI, O.M., OLIVEIRA, C.D., BERGAMINI, A.M.M., CAPUANO, D.M., OKINO, M.H.T., FEBRÔNIO, L.H.P., CASTRO E SILVA, A.A.M.C., OLIVEIRA, M.A., RIBEIRO, E.G.A., TAKAYANAGUI, A.M.M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 37 – 41, 2001.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WATCHEL, M.R., WHITEHAND, L.C., MANDRELL, R.E. Prevalence of **Escherichia coli** associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated sewage wastewater. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 471-475, 2002a.

WATCHEL, M.R.; WHITEHAND, L. C.; MANDRELL, R. E. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 18 – 25, 2002b.

WATTERWORTH, L., TOPP, E., SCHRAFT, H., LEUNG, K.T., Multiplex PRC-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 93 – 105, 2004.

WILLER, H.; KLICHER, L. **The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2009**. IFOAM, 2009.

XIA, X, MENG, J. MCDERMOTT, P.F., AYERS, S., BLICKENSTAFF, K., TRAN, T., ABBOT, J., ZHEN, J., ZHAO, S. Presence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1709-1717, 2010.