



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

NAYARA BENEDITO MARTINS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)
COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE ALEGRE-ES**

ALEGRE - ES
JULHO - 2013

NAYARA BENEDITO MARTINS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)
COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE ALEGRE-ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Wilmer Edgard Luera Peña
Coorientador: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho
Coorientador: Prof^a. DSc. Patrícia Campos Bernardes

ALEGRE - ES
JULHO - 2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Silva, Nayara Benedito Martins da, 1988-

S586a Avaliação da microbiota de alface (*Lactuca sativa*) comercializada no município de Alegre-ES / Nayara Benedito Martins da Silva. – 2013.

52 f. : il.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.

Coorientadores: Patrícia Campos Bernardes ; Raquel Vieira de Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Alface. 2. Alface – Comercialização – Alegre (ES). 3. *Salmonella* spp. 3. Alimentos contaminados – Prevenção. 4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) I. Peña, Wilmer Edgard Luera. II. Bernardes, Patrícia Campos. III. Carvalho, Raquel Vieira de. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 664

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)
COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE ALEGRE-ES**

Nayara Benedito Martins da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 29 de julho de 2013.

Prof. DSc. Elisabete Fantuzzi
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro Externo)

Prof. DSc. Patrícia Campos Bernardes
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro Interno)

Prof. DSc. Raquel Vieira de Carvalho
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro Interno)

Prof. DSc. Wilmer Edgard Luera Peña
Universidade Federal de Viçosa
(Orientador)

“... E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais...”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pelas oportunidades, força e coragem para seguir em frente e não desanimar.

À minha família, principalmente meus pais que tanto se esforçaram para que eu chegasse até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Wilmer Edgard, pela orientação, pelo desafio proposto, pelos ensinamentos e paciência.

As professoras Patrícia e Raquel pela participação, paciência, disponibilidade, apoio e ensinamentos.

Ao professor Sérgio Saraiva pelo auxílio na definição da análise estatística.

A toda família PCTA: amigos, professores e “agregados”, pela boa convivência, alegrias e até mesmo dificuldades compartilhadas.

À amiga Lorane pela companhia nos inúmeros finais de semana e madrugadas em que passamos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Aos estagiários Leticya, Ana Lúcia, Sérgio e Erick pela ajuda na execução do projeto.

Às amigas de República, Letícia, Rená, Livinha, Rayana, Amanda, Taís, Flávia Baioco, Flávia Compassi e Fernanda pelos bons momentos durante esses dois anos.

À professora Regina pela disponibilidade de uso do Laboratório de Análises Microbiológicas de Patógenos de Origem Animal e Hídrica do Departamento de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Viçosa.

E a todas as pessoas que de certa forma contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. HORTALIÇAS.....	3
2.1.1. Consumo de hortaliças frescas e benefícios à saúde	3
2.1.2. Alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	4
2.1.3. A microbiota das hortaliças.....	5
2.1.3.1. Patógenos em hortaliças	6
2.1.3.2 <i>Salmonella</i> spp.....	8
2.2. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. EM ALIMENTOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	15
3.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE ALFACE.....	16
3.2.1. Contagem de aeróbios mesófilos	16
3.2.2. Contagem de fungos filamentosos e leveduras.....	17
3.2.3. Determinação de coliformes totais e termotolerantes.....	17
3.2.4. Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> spp.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA NATURAL DA ALFACE CRESPA.....	20
4.2. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>Salmonella</i> spp. EM ALFACE CRESPA.....	28
5. CONCLUSÕES.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

SILVA, Nayara Benedito Martins da. **Avaliação da microbiota de alface (*Lactuca sativa*) comercializada no município de Alegre-ES.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof. DSc. Wilmer Edgard Luera Peña. Co-orientador (es): Prof. DSc. Patrícia Campos Bernardes. Prof. DSc. Raquel Vieira de Carvalho.

As hortaliças são uma fonte importante de vitaminas, minerais e fibras, que são essenciais para o bom funcionamento do organismo, por isso cada vez mais cresce o seu consumo. A alface é uma das hortaliças mais consumidas no Brasil, principalmente na sua forma crua, entretanto nos últimos anos tem sido associada a surtos alimentares. Várias metodologias podem ser utilizadas para determinação de micro-organismos em alimentos. No entanto, é crescente a necessidade da utilização de métodos que proporcionem resultados mais rápidos. Dessa forma a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado uma ferramenta eficaz para tal finalidade. Este trabalho objetivou em avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em alface (*Lactuca sativa*) do tipo crespa, comercializada no município de Alegre-ES. Para realização do estudo foram utilizadas 60 amostras de alface do tipo crespa e cultivo convencional comercializadas na feira livre e outros estabelecimentos da cidade. Foi realizada a determinação dos seguintes grupos microbianos nas amostras avaliadas: mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, coliformes totais e termotolerantes. A determinação da ocorrência de *Salmonella* spp. ocorreu por meio das seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo-diferencial e para confirmação foi utilizada a técnica de PCR. Foram avaliados 11 estabelecimentos, incluindo a feira livre. As amostras analisadas apresentaram contagens médias de mesófilos aeróbios de 6,80 log UFC.g⁻¹ e fungos filamentosos e leveduras de 4,07 log UFC.g⁻¹. Foi constatado que 100 % das amostras apresentaram coliformes totais e, com relação à presença de coliformes termotolerantes, 58 % das amostras apresentaram valores < 3 NMP g⁻¹, 30 % entre 4 e 21 NMP g⁻¹, e 12 % entre 43 e 93 NMP g⁻¹. Pela técnica de PCR, 21,66 % (n = 13) das 60 amostras de alface avaliadas foram consideradas positivas para *Salmonella* spp. As amostras positivas para *Salmonella* spp. foram provenientes de oito dos 11 estabelecimentos avaliados. A partir dos resultados obtidos ressalta-se a importância da adoção de medidas preventivas para reduzir a contaminação da alface *in natura* e demais hortaliças ao longo de toda cadeia produtiva, como uma forma de reduzir os riscos à saúde associados ao consumo deste alimento.

Palavras-chave: alface, *Salmonella* spp., reação em cadeia da polimerase (PCR)

ABSTRACT

SILVA, Nayara Benedito Martins da. **Evaluation of the microbiota of lettuce (*Lactuca sativa*) commercialized in the city of Alegre-ES.** Dissertation (MSc in Food Science and Technology) - Federal University of Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Prof. Dr. Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisor(s): Prof. Dr. Patrícia Campos Bernardes. Prof. Dr. Raquel Vieira de Carvalho.

Vegetables are an important source of vitamins, minerals and fibers, which are essential for good functioning of the organism; therefore its consumption has been grow. Lettuce is one of the most consumed vegetables in Brazil, especially raw, however in the recent years it has been associated to food outbreaks. Several methods can be used to determine micro-organism in food. Thus, the use of effective methods are increasing and can simultaneously provide faster results. The technique of polymerase chain reaction (PCR) has shown to be an effective tool for this purpose. The objective of this study was to evaluate the occurrence of *Salmonella* spp. in lettuce (*Lactuca sativa*) type crisp, commercialized in the city of Alegre-ES. For this study, 60 samples of crisp type lettuces and conventional cultivation commercialized in outdoor markets, supermarkets and produce stores in the city were used. The determination of the presence of *Salmonella* spp. was accomplished through the following steps: pre-enrichment, selective enrichment, selective-differential plating and to confirm the results, the PCR technique was utilized. Eleven establishments were evaluated. Furthermore, determinations of the following microbial groups in the tested samples were done: aerobic mesophilic, filaments fungi and yeast, total and thermotolerant coliforms. The samples analyzed presented average counts of aerobic mesophilic of 6.80 log CFU. g⁻¹ and filaments fungi and yeast of 4.07 log CFU. g⁻¹. It was found that 100 % of the samples presented total coliform and in relation to the presence of thermotolerant coliforms 58 % of the sampled showed values <3 MPN g⁻¹, 30 % between 4 and 21 MNP g⁻¹, and 12 % between 43 and 93 MPN g-1. Through the PCR technique, 21,66 % (n=13) of the 60 samples of lettuce evaluated was considered positive for *Salmonella* spp. *Salmonella* spp. positive samples were obtained from 8 of the 11 establishments evaluated. From these results it is noteworthy the importance of adopting preventive measures to reduce the contamination of lettuce *in natura* and other fresh vegetables throughout the production chain as a way to reduce health risk associated with the consumption of this food.

Keywords: lettuce, *Salmonella* spp., polymerase chain reaction (PCR)

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos patogênicos e deterioradores ainda são um problema mundial no que diz respeito à segurança do alimento, mesmo com o desenvolvimento e a utilização de práticas de conservação de alimentos (JUNEJA; HUANG; YAN, 2011). Além disso, os patógenos de origem alimentar já bem conhecidos como *Salmonella* ssp. e *Escherichia coli*, parecem ter evoluído para explorar novos nichos como os alimentos frescos, e até mesmo gerar novos desafios para saúde pública, como a resistência antimicrobiana (NEWELL et al., 2010).

As práticas alimentares saudáveis têm sido associadas à promoção da saúde. Nos últimos anos, inúmeros tem sido os relatos da associação do consumo de hortaliças e seu benefício à saúde. As hortaliças são importantes fontes de vitaminas, sais minerais e fibras, portanto seu consumo tem aumentado entre aqueles que buscam uma alimentação mais saudável. Todavia, a falta de capacitação dos produtores e dos manipuladores de alimentos, a escassez de recursos e de informações muitas vezes impede que as boas práticas de produção sejam realizadas, o que pode comprometer a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos.

Apesar dos benefícios para a saúde, as hortaliças têm sido associadas às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) e surtos alimentares. Diversos fatores têm influenciado o aumento dos surtos alimentares ocasionados por produtos frescos, por exemplo, aumento do consumo de produtos orgânicos, além de mudanças nas práticas agrônômicas, de processo e de distribuição (ROEVER, 1998; NACMCF, 1999; PARISH, et al. 2003; NUORTI, et al. 2004; BERGER et al., 2010).

O excesso de manipulação, desde a produção até a chegada a mesa do consumidor, pode aumentar as chances das hortaliças serem contaminadas com micro-organismos deterioradores e/ou patogênicos. Dessa forma, tornam-se importante a avaliação e o monitoramento da qualidade das hortaliças, principalmente as que são consumidas na forma crua.

A alface (*Lactuca sativa*) está entre as hortaliças mais comercializadas no país. O consumo se dá na forma de saladas cruas, mas também pode ser

utilizada em outras preparações como sanduíches, além da decoração de pratos.

Diversos métodos podem ser utilizados para determinação dos micro-organismos em alimentos. No entanto, tem se preconizado o desenvolvimento de metodologias que proporcionem resultados rápidos. Nesse contexto as técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm ganhado destaque.

Assim os objetivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar as condições microbiológicas da alface comercializada no município de Alegre – ES, pela determinação dos grupos microbianos presentes.
- b) Avaliar a incidência de *Salmonella* spp. em alface comercializada no município de Alegre – ES pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HORTALIÇAS

De acordo com Filgueira (2008), o termo hortaliça é referente ao grupo de plantas que apresentam, em sua maioria: consistência tenra, não-lenhosa; ciclo biológico curto; tratos culturais intensivos; cultivos em áreas menores, em relação às grandes culturas; e sua utilização na alimentação humana não exige preparo industrial. As hortaliças são popularmente conhecidas como verduras e legumes.

2.1.1. Consumo de hortaliças frescas e benefícios à saúde

De acordo com a *World Health Organization* (WHO) (2002) o consumo diário de verduras e frutas pode ajudar na prevenção de alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares. Existem vários mecanismos pelos quais estes efeitos protetores podem ser mediados, envolvendo substâncias antioxidantes e outros nutrientes que podem ser encontrados nas hortaliças, tais como os flavonóides, carotenóides, vitamina C e ácido fólico. Estas e outras substâncias bloqueiam ou suprimem a ação de substâncias cancerígenas e, como antioxidantes, podem evitar danos oxidativos no DNA.

A ingestão de hortaliças e frutas contribui para o consumo de uma alimentação saudável e variada. A recomendação é de que sejam ingeridos diariamente 400 g de frutas e vegetais por dia, excluindo batatas e outros tubérculos amiláceos (WHO/FAO, 2003). Além disso, o baixo consumo de verduras e frutas é considerado como um dos principais fatores de risco para a morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2002; WHO, 2006).

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF 2008-2009), nesse período 3,3 % do orçamento de cada domicílio brasileiro foram gastos na compra de legumes e verduras. E a média de aquisição domiciliar *per capita* anual de hortaliças no país, em 2008-2009, foi de 27,1 Kg, no Espírito Santo a média foi de 24,3 Kg (IBGE, 2010a; IBGE, 2010b).

Algumas pesquisas na área da saúde têm apontado o benefício do consumo de hortaliças entre elas a alface. Essas pesquisas envolvem desde estudo com modelo animal sugerindo que a alface parece exercer efeitos positivos sobre os fatores de risco para doenças cardiovasculares, devido ao seu alto teor de fibra, e possivelmente por outros micronutrientes, até estudos que utilizam a hortaliça como fonte de fibras para ser empregada em nutrição enteral ou suplemento nutricional oral (NICOLLE, et al., 2004; ARAÚJO; MENEZES, 2007). Além disso, pesquisadores brasileiros têm trabalhado no desenvolvimento de plantas de alfaces com maior teor de ácido fólico, substância essa que pode ter sua baixa ingestão associada a doenças do sistema nervoso como depressão e anencefalia (BEZERRA, 2012).

Uma alimentação saudável envolve alguns atributos básicos como variedade, acessibilidade física e financeira, além de segurança sanitária. (BRASIL, 2006). A garantia da segurança e qualidade dos alimentos do ponto de vista sanitário faz parte da Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) (BRASIL, 2012). Dessa forma os governos devem incentivar a promoção de uma alimentação saudável, mas que seja de qualidade para que a mesma não seja fonte de riscos para a saúde da população.

2.1.2. Alface (*Lactuca sativa*)

A alface é uma planta herbácea, delicada, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas que podem ter coloração em vários tons de verde, ou roxa, conforme a cultivar (FILGUEIROA, 2008). É uma hortaliça de folhas comestíveis que podem ser lisas ou crespas. A maior produção ocorre no período de abril a dezembro, mas seu cultivo, dependendo da cultivar, pode ser realizado durante todo o ano, sendo que a variedade crespa corresponde a 40 % da comercialização (MORETTI; MATOS, 2005; EMBRAPA, 2010).

Existem controvérsias sobre o local de origem da alface. Alguns autores sugerem que sua origem se deu na região do mediterrâneo, mas existem aqueles que relatam locais como Egito, sudoeste da Ásia e Oriente Médio (VRIES, 1997; RYDER, 2002). A alface foi possivelmente introduzida na América em 1494, com as expedições de Cristóvão Colombo para o Novo

Mundo (RYDER, 2002). Já no Brasil, sua introdução foi feita em 1650, pelos portugueses (SALA; COSTA, 2012).

Segundo Sala e Costa (2012) a substituição do cultivo da alface crespa, com relação a tradicional alface lisa, foi uma das grandes mudanças na alfacultura brasileira nas últimas décadas. Até a década de 1980 o sistema de cultivo de alface no Brasil foi dominado pela variedade lisa. Mas os agricultores enfrentavam dificuldades de produção na região sudeste. Durante o verão essa região é caracterizada por temperaturas elevadas associadas à alta pluviosidade, o que favorecia a deterioração por fungos e bactérias devido a elevada umidade relativa, levando a perdas de até 60 % da produção. A partir da década de 1990 ocorreu uma mudança de produção para o tipo crespa. A alface tipo crespa mostrou-se mais adequada ao cultivo no verão, além de se adequar melhor a forma de comercialização que é realizada em caixas de madeira.

Os diferentes tipos de alface possuem em média a cada 100 g: 96 % de água; 1,1 g de proteínas; 2,1 g de carboidratos; 11,1 g de fibras; e minerais como cálcio, fósforo e potássio, vitaminas A, C e outras, além de baixo valor calórico 37,3 kcal (NEPA, 2011). O baixo preço, aliada as propriedades nutricionais são características que fazem com que a hortaliça seja uma das mais consumidas em todo o Brasil.

Segundo o Censo Agropecuário, referente ao ano de 2006, o Brasil produziu 525.602 toneladas de alface (IBGE, 2009). E de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2008-2009), a aquisição domiciliar *per capita* anual de alface foi de 0,9 kg (IBGE, 2010b).

2.1.3. A microbiota das hortaliças

Os produtos frescos, como as hortaliças, possuem uma microbiota natural bem diversificada, que normalmente está relacionada ao ambiente de cultivo.

As bactérias e os fungos conseguem se desenvolver na superfície das hortaliças, no entanto, as bactérias se multiplicam mais rapidamente. O tipo de micro-organismo que poderá se desenvolver e o aumento da população microbiana, vão depender das diversas etapas após o processo de colheita. A

população de micro-organismos pode chegar a uma contagem entre 6 e 7 log de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC.g⁻¹), sem que o produto apresente sinais de deterioração (BRACKETT; SPLITTSTOESSER, 2001).

As bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* fazem parte do grupo de coliformes totais, porém estão presentes naturalmente nas hortaliças o que não necessariamente indicará contaminação fecal recente (FRANCO; LADGRAF, 2005).

A determinação de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, coliformes e *Salmonella* spp., estão dentre as análises microbiológicas recomendadas pela *American Public Health Association* (APHA) para as hortaliças. Em relação às hortaliças *in natura*, inteiras, selecionadas ou não, a legislação brasileira, por meio da RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina padrões microbiológicos apenas para *Salmonella* spp., determinando ausência deste micro-organismo em 25 g do produto (BRASIL, 2001).

2.1.3.1. Patógenos em hortaliças

Os benefícios à saúde, associados à ingestão de hortaliças, têm contribuído para o aumento do seu consumo, o que tem levado à preocupação com a qualidade desses produtos. Essa qualidade está relacionada com as características nutricionais, sensoriais e microbiológicas (SÃO JOSÉ; VANETTI, 2012).

A morfologia, a composição e o metabolismo das hortaliças podem proporcionar condições favoráveis para que diferentes tipos de micro-organismos possam se desenvolver. Os fatores extrínsecos e intrínsecos são determinantes para o tipo de micro-organismo e, conseqüentemente, o tipo de deterioração que ocorre em hortaliças (PARISH, et al, 2003; SCF, 2002). Os riscos biológicos associados com hortaliças folhosas como a alface são atribuídos a fatores como curto ciclo de produção, colheita manual, grande área superficial da folha e seu consumo na forma *in natura* (OMAF, 2001).

As hortaliças podem ser fonte de diversos patógenos como bactérias, fungos, vírus e protozoários. No entanto, as bactérias são o alvo de maior

interesse e diferentes espécies são comumente associadas a surtos alimentares, tais como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas ssp*, *Clostridium ssp*, *Vibrio cholerae* (WHO, 1998; NACMCF, 1999; PARISH et al., 2003).

Nos últimos dez anos, no Brasil, o agente etiológico mais identificado em surtos alimentares foi a *Salmonella ssp*. (BRASIL, 2013). Com relação às infecções causadas por patógenos que são veiculados por alimentos, infecções causadas por *Salmonella ssp*. ainda são as mais frequentes nos Estados Unidos, não ocorrendo reduções significativas em mais de uma década (CDC, 2011).

A prevalência de bactérias em hortaliças está relacionada com a probabilidade de contaminação e a concentração de patógenos, que por sua vez, estão fortemente associadas com as condições ambientais, sobretudo as alterações climáticas. As condições meteorológicas influenciam o transporte e disseminação de patógenos. As fontes mais prováveis de contaminação das hortaliças no campo são o solo, o adubo, a água de irrigação, o esgoto e os animais silvestres (FRANZ, et al., 2008; LIU; HOFSTRA; FRANZ, 2013).

Alguns pontos, tais como, condições do ambiente de produção, insumos utilizados (adubo, sementes, água), equipamentos associados ao cultivo e a colheita, manuseio pós-colheita, transporte e outros, devem ser controlados de forma a garantir a produção de hortaliças de qualidade (MORETTI, 2003).

No Brasil dados do Ministério da Saúde, de 1999 a 2004, mostram a ocorrência de 3.410.048 internações por DTAs (BRASIL, 2005). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que, por ano, cerca de 48 milhões de pessoas ficam doentes, e 3.000 pessoas morrem nos Estados Unidos devido as DVAs (CDC, 2013a). Estima-se que, anualmente, 41 % das hospitalizações, associadas a surtos alimentares nos Estados Unidos, são relacionadas a produtos de origem vegetal, sendo que destes, 14 % são devido a hortaliças folhosas (PAINTER et al., 2013). De acordo com a *Public Health Agency of Canada* (PHAC, 2013) anualmente quatros milhões de canadenses, ficam doentes devido as DVAs. Mas é importante ressaltar que comparações entre as estimativas de diferentes países são difíceis de fazer, devido às

diferenças inerentes com relação a abordagens metodológicas e fontes de dados (THOMAS et al., 2013).

Além de causar prejuízos à saúde as DTAs promovem altos custos para os governos. Do período de 1999 a 2004 os custos com casos de internação por DTAs, no Brasil, chegaram a 280 milhões de reais (BRASIL, 2005). No entanto, esse valor pode estar subestimado, uma vez que, deve-se considerar que em muitas regiões os casos e surtos de DTAs não são notificados. Essa notificação depende da comunicação da população, da capacidade de identificação dos profissionais de saúde, e da implementação de um sistema de vigilância epidemiológica das DTAs (BRASIL, 2011).

Os dados e estatísticas referentes à epidemiologia das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda são escassos em alguns estados e/ou municípios (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006). É importante ressaltar que a subnotificação dos surtos de origem alimentar pelos serviços de vigilância epidemiológica é uma realidade mundial, países desenvolvidos como Canadá, também chamam a atenção para esse processo de subnotificação (SHINOHARA, 2008; NEWELL, et al. 2010; PHAC, 2013)

No Brasil entre o período de 2000 a abril de 2013, 110 surtos alimentares foram relacionados com o consumo de hortaliças. Dos nove surtos de DVAs ocorridos entre janeiro a abril de 2013, em um deles o alimento envolvido foi uma hortaliça (BRASIL, 2013).

O consumo da alface tem sido, nos últimos anos, relacionado com alguns surtos alimentares que envolvem diversos patógenos, entre eles, *Salmonella* spp. (ACKERS, et al., 1998; HEATON; JONES, 2007). Alguns estudos desenvolvidos com alface no Brasil detectaram a presença deste patógeno (TAKAYANAGUI, et al., 2006; ARBOS, et al., 2010; SANT'ANA, et al., 2011).

2.1.3.2. *Salmonella* spp.

Os micro-organismos do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. O pH ótimo de crescimento é

próximo a neutralidade, a temperatura de crescimento varia entre 5 e 45°C e a atividade de água mínima para o crescimento é de 0,94 (JAY, 2005; SILVA et al., 2007).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* é complexa, muitas vezes combina vários sistemas dividindo o gênero em espécies, subespécies, subgêneros, grupos, subgrupos e sorovares, o que pode gerar confusão. Os sorovares existentes são agrupados em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* por sua vez, é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* and *S. enterica* subsp. *indica* (BRENNER et al., 2000; GRIMONT;WEILL, 2007). De acordo com o *Institut Pasteur* (França), centro de pesquisa e referência em *Salmonella*, até 2007 já haviam sido identificados 2.579 sorovares (GRIMONT;WEILL, 2007).

Dependendo do sorotipo as espécies do gênero *Salmonella* podem causar dois tipos de infecções: (1) as febres tifóide e paratifóide provocadas por *S. sorovar Typhi* e *S. Paratyphi A, B e C*, e (2) as gastroenterites causados pelos demais sorotipos. Os sorotipos da febre tifóide e paratifóide são encontrados apenas em humanos, com efeito, mesmo após o tratamento com alguns indivíduos podem se tornar portadores assintomáticos (FDA, 2012). A gravidade e duração dos sintomas dependem de fatores como sorotipo, dose ingerida e características do hospedeiro.

Os principais sintomas da salmonelose são diarreia, febre, cólicas abdominais, em casos mais graves os indivíduos podem desenvolver artrite crônica ou um quadro de septicemia. Na maioria dos casos, as pessoas não precisam de tratamento para se recuperar, mas nos Estados Unidos, anualmente, cerca de 400 pessoas morrem devido à salmonelose aguda (CDC, 2012). Normalmente, ocorre a colonização do intestino pela adesão das bactérias as células epiteliais. As células bacterianas invadem a mucosa intestinal e se multiplicam no tecido linfóide associado ao intestino (GALT). *Salmonella* spp. abriga grandes aglomerados de genes de virulência, denominados ilhas de patogenicidade, estas ilhas contêm genes necessários

para os diferentes papéis na patogênese gastrointestinal e sistêmica (FORTES, et al., 2012).

Os reservatórios naturais deste micro-organismo são os animais, no entanto alimentos com baixo teor de umidade como especiarias e chocolate, além de hortaliças, como a alface, podem transmitir este patógeno e serem associados com surtos de salmoneloses, (HARRIS, et al. 2003; HEATON; JONES, 2007; WHO, 2007; MACEDO, 2012).

De acordo com o relatório sobre surtos de origem alimentar que ocorreram na última década (2001 – 2010) nos Estados Unidos, divulgado pelo *Center For Science in the Public Interest*, *Salmonella* spp. esteve envolvida em dois dos quatros maiores surtos desse período (DeWAAL; GLASSMAN, 2013). Entre os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados dos casos de infecções, nos Estados Unidos em 2012, o sorotipo Enteritidis foi o mais frequente (GOULD, et al. 2013).

2.2. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM ALIMENTOS

O método tradicional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos tem a finalidade de determinar o micro-organismo mesmo em condições desfavoráveis. As etapas recomendadas pelos mais diversos órgãos reguladores, são basicamente quatro (ANDREWS et al., 2001; BRASIL, 2003; SILVA et al., 2007):

Pré-enriquecimento: é realizado em caldo não seletivo e tem por objetivo recuperar as células injuriadas, o meio pode ser determinado de acordo com o tipo de alimento analisado, no entanto, os mais utilizados são Caldo Lactosado e Água Peptonada Tamponada.

Enriquecimento seletivo: tem por objetivo inibir a multiplicação da microbiota competidora e promover multiplicação das células de *Salmonella* spp. É recomendada a utilização de dois meios diferentes, devido à variação que cada cepa de *Salmonella* spp. pode apresentar aos agentes seletivos. Caldo Tetrionato, Caldo Selenito Cistina, Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado ou Rappaport-Vasiliadis Soja são os meios recomendados para

essa etapa. No Caldo Tetracionato os coliformes e outras enterobactérias que não reduzem o tetracionato são suprimidas, o verde brilhante e o desoxicolato de sódio inibem as bactérias gram positivas. No Caldo Selenito Cistina a L-cistina melhora a recuperação da *Salmonella* spp. e o selenito de sódio inibe os coliformes e enterococos. No caldo Rappaport-Vasiliadis a seletividade é devido a presença de verde de malaquita, a alta pressão osmótica (alta concentração de cloreto de magnésio) e pH relativamente ácido que atuam sobre a microbiota acompanhante, já a digestão papáica da farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella* spp.

Plaqueamento seletivo diferencial: objetiva promover a multiplicação das colônias de *Salmonella* spp. em meios diferenciais que possam diferenciá-las da microbiota acompanhante. É recomendada a utilização de dois ou mais meios. Alguns dos meios que podem ser utilizados nessa etapa incluem: Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose, Ágar Hektoen Entérico, Ágar *Salmonella* Diferencial, Ágar Verde Brilhante, Ágar Bismuto Sulfito, Ágar Rambach, Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, Ágar *Salmonella Shigella*. Os meios mais utilizados são os que diferenciam a *Salmonella* por meio da não fermentação da lactose e da produção de H₂S, no entanto, como existem colônias que podem apresentar características atípicas, recomenda-se que o segundo ou terceiro meio não seja baseado nessas duas características.

Confirmação por meio de testes bioquímicos e sorológicos: A confirmação bioquímica é baseada na evidenciação do perfil característico das cepas de *Salmonella* spp. Nessa etapa os meios comumente utilizados em laboratório podem ser substituídos por *kits* bioquímicos comerciais. Podem ser utilizados diversos testes como: Teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Teste de descarboxilação da lisina (LIA), Teste de urease, Teste de citrato, Teste de Indol e Teste de crescimento em KCN (caldo cianeto de potássio) (Tabela 1).

Tabela 1. Características bioquímicas típicas de *Salmonella*

Teste bioquímico	Reação positiva
TSI	Rampa alcalina (vermelha), fundo ácido (amarelo), com produção de gás (bolhas ou rachaduras no meio de cultura), com ou sem produção de H ₂ S (escurecimento ou não do meio)
LIA	Base e ápice cor púrpura, presença ou ausência de H ₂ S.
Teste de urease	Alteração da cor do meio de pêssego para cor de rosa
Teste de citrato	Alteração da cor do meio de verde para azul
Teste de indol	Anel vermelho–violeta na superfície do meio
KCN	Turvação do meio, indicando crescimento positivo

Fonte: Silva, et al. 2007.

Como algumas espécies podem produzir reações bioquímicas atípicas se faz necessária à utilização da sorologia. O gênero *Salmonella* é sorologicamente caracterizado por componentes antígenos específicos. Esses antígenos são classificados em somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi).

No entanto, o método tradicional pode demandar muito tempo para ser realizado e ser trabalhoso. Além disso, estes métodos sofrem de baixa especificidade, devido, por exemplo, a dificuldades na recuperação de células lesadas ou problemas na identificação de colônias atípicas (LÖFSTRÖM, 2010).

Devido à gravidade da *Salmonella*, como um agente patogênico transmitido por alimentos, muito esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento e melhoria dos métodos de detecção. Além disso, o aumento dos surtos de origem alimentar tem destacado a importância do desenvolvimento de métodos rápidos e específicos na detecção dos micro-organismos patogênicos de origem alimentar (ELIZÁQUIVEL, 2012).

Diversos métodos baseados na detecção de macromoléculas intracelulares tais como proteínas, DNA e RNA têm sido desenvolvidos, e para ganhar aceitação, os métodos devem apresentar resultados semelhantes àqueles obtidos com os métodos tradicionais baseados nos meios de cultura. Para a escolha do método é importante considerar diversos fatores, tais como, baixo limite de detecção, custos, rapidez, facilidade de manuseio e aceitação

internacional. Os métodos moleculares utilizados para detecção de *Salmonella* spp. podem ser divididos em duas categorias principais: (1) técnicas imunológicas, como por exemplo, os ensaios de ELISA e (2) ensaios baseados em ácidos nucleicos, como por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR) e microarranjos (LÖFSTRÖM, 2010)

Neste sentido, as técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (em inglês, Polymerase Chain Reaction – PCR), têm demonstrado ser uma ferramenta valiosa para detectar bactérias em diferentes matrizes alimentares. Os resultados podem ser obtidos em cerca de um dia, dependendo do patógeno, tempo bem menor do que o exigido pelos métodos tradicionais que podem demorar vários dias. Isto é particularmente importante para as hortaliças que são produtos altamente perecíveis (MALORNY et al., 2003). A técnica é rápida, tem bom limite de detecção e seletividade (AABO et al., 1993). Outra vantagem da técnica é a capacidade de detecção de células mortas ou viáveis mais não cultiváveis, e a possibilidade de eliminar etapas de plaqueamento seletivo, identificação bioquímica e sorológica (CANDRIAN, 1995; POSTOLLEC, 2011).

A técnica de PCR é baseada em uma amplificação enzimática de sequências alvo de ácidos nucleicos utilizando um par de oligonucleotídeos específicos e uma DNA polimerase termoestável. Os produtos replicados normalmente são detectados por meio de eletroforese em um gel de agarose (LANTZ; HÄGERDAL; RADSTROM, 1994). Inicialmente na técnica de PCR, para catalisar a reação de extensão do DNA, foi utilizada uma DNA polimerase extraída de *E. coli*. Porém essa enzima era desnaturada ao final do processo devido as altas temperaturas utilizadas, necessitando assim a adição de uma enzima fresca a cada ciclo. Atualmente, a DNA polimerase utilizada foi isolada de uma bactéria termófila *Thermus aquaticus*, e esta enzima suporta as altas temperaturas exigidas para a desnaturação da cadeia dupla de DNA (HARRIS; GRIFFITHS, 1992).

Várias abordagens de diagnóstico molecular para a detecção e análise de patógenos em alimentos têm sido desenvolvidas (PERELLE et al., 2004; O'GRADY et al., 2009; KIM; CHO, 2010). Nesse contexto, diversos estudos

estão utilizando a técnica de PCR para identificação de *Salmonella* spp. isolada de alimentos.

Alcocer et al. (2006) utilizaram PCR para caracterizar molecularmente os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango. Durante um estudo que objetivou monitorar a contaminação de hortaliças por *Salmonella* PCR foi utilizada para confirmar isolados típicos do patógeno (AYTAC, et al., 2010). A técnica de também já foi utilizada para detecção de *Salmonella* spp. em água de lavagem de carcaças de frango (RISSATO et al., 201). Osman et al. (2011) utilizaram a técnica de PCR para identificação dos genes que determinam a sobrevivência de *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* em ovos de galinha. A caracterização de *Salmonella* encontrada em amostras de vários tipos de alimentos, em um estudo na Nigéria, foi realizada por PCR (SMITH et al., 2012)

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA - UFES). A análise de PCR foi realizada no Laboratório de Análises Microbiológicas de Patógenos de Origem Animal e Hídrica (LAMPOH) do Departamento de Tecnologia da Universidade Federal de Viçosa (DTA – UFV).

3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Inicialmente foi realizado um levantamento dos estabelecimentos que comercializam alface e eram cadastrados na Vigilância Sanitária do município. Após esse levantamento inicial, foi realizada uma visita aos estabelecimentos para saber quais deles comercializava alface crespa. Para avaliação das condições higiênico-sanitárias as amostras foram obtidas em 11 pontos de coleta, sendo: dez estabelecimentos comerciais e um produtor que comercializava a hortaliça na feira livre da cidade.

Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC). As amostras foram coletadas sempre no período da manhã, entre os meses de novembro de 2012 e março de 2013. Foram analisadas 60 amostras de alface, do tipo crespa e de cultivo convencional (Tabela 2). Como unidade amostral utilizou-se três unidades de alface. Os resultados obtidos foram comparados com os padrões microbiológicos definidos na RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001).

Tabela 2. Número de coletas realizadas por estabelecimento

Estabelecimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Números de Amostras	6	6	3	6	8	6	6	6	7	2	4

A análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de probabilidade foi realizada para interpretação das análises microbiológicas obtidas no experimento, com exceção dos resultados para coliformes. O programa Sistema para Análises Estatísticas - SAEG (2007) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

3.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE ALFACE

As amostras de alface foram coletadas assepticamente e de forma aleatória. Em seguida foram acondicionadas em sacolas plásticas individuais esterilizadas e transportadas em caixas de isopor com gelo até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CCA-UFES para a realização das análises microbiológicas. Foram utilizadas para as análises apenas as folhas íntegras. As folhas de alface foram lavadas em água destilada esterilizada para remoção das sujidades.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo a metodologia da *American Public Health Association* (APHA) e descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (ANDREWS et al., 2001).

Foram preparados homogenatos, utilizando-se 25 g da amostra adicionados a 225 mL de água peptonada 0,1 %. Do homogenato foram preparadas as diluições decimais subsequentes.

3.2.1. Contagem de mesófilos aeróbios

Para enumeração de mesófilos aeróbios utilizou-se o método de plaqueamento em profundidade em meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Himedia[®]). Foi transferido 1 mL em triplicata, das respectivas diluições para placas de Petri esterilizadas e adicionados cerca de 15 mL de PCA (Himedia[®]). As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C / 48 ± 2 h. Os resultados foram expressos em UFC.g⁻¹.

3.2.2. Contagem de fungos filamentosos e leveduras

Para enumeração de fungos filamentosos e leveduras, foi utilizado o plaqueamento em superfície. As placas incubadas foram incubadas a 22 – 25 °C / 5 dias. Foi inoculado 0,1 mL, das respectivas diluições sobre a superfície do meio Ágar Batata Dextrose (BDA) (Himedia[®]) acidificado com ácido tartárico (pH entre 3,5 e 3,7) em triplicata. Com auxílio de uma alça de drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio, até sua completa absorção. Os resultados foram expressos em UFC.g⁻¹.

3.2.3. Determinação de coliformes totais e termotolerantes

Coliformes totais e termotolerantes foram enumerados com o auxílio da técnica do Número Mais Provável (NMP). No teste presuntivo, alíquotas de 1 mL das três diluições da amostra foram inoculadas em uma série de três tubos Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Himedia[®]) por diluição. Os tubos foram incubados a 35 ± 0,5 °C / 24 – 48 ± 2h. Os tubos com produção de gás foram considerados suspeitos. Uma alçada de cada tubo suspeito foi transferida para tubos com Caldo Verde Brilhante Bile 2 % (VB) (Himedia[®]) que foram incubados a 35 ± 0,5 °C / 48h ± 2h para confirmação da presença de coliformes totais. Para confirmação de coliformes termotolerantes uma alçada de cada tubo suspeito foi transferida para tubos com Caldo EC (Himedia[®]) e, posteriormente, incubados a 45, 5 °C / 24h. Os resultados foram expressos em NMP por grama (NMP.g⁻¹).

3.2.4. Avaliação da presença de *Salmonella* spp.

A determinação da presença do gênero *Salmonella* spp. foi realizada conforme metodologia descrita abaixo:

Pré-enriquecimento: amostras de 25 g da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de Caldo Lactosado (CL) (Himedia[®]) e os homogenatos foram incubados a 35 °C/ 24 ± 2h.

Enriquecimento seletivo: alíquotas de 1 mL do pré-enriquecimento foram inoculadas, em tubos contendo 10 mL de Tetracionato Verde Brilhante e em tubos contendo 10 mL de Selenito Cistina (Himedia[®]), e posteriormente

incubados a 35 °C / 24 ± 2h.

Plaqueamento seletivo-diferencial: a partir dos caldos de enriquecimento seletivo, foi realizado o isolamento das colônias suspeitas por meio de estrias na superfície dos meios ágar Entérico Hectoen (HE) (Himedia[®]), Ágar *Salmonella* Diferencial Modificado (Himedia[®]) e ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) (Himedia[®]). As placas com o meio seletivo foram incubadas a 35 °C / 24 ± 2h. As colônias com características de *Salmonella* spp. que cresceram em cada meio seletivo foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia[®]) a 35 °C / 24h e mantidas à – 80 °C, em caldo BHI contendo 20 % de glicerol até o momento da análise de PCR.

Análise da reação em cadeia em polimerase (PCR): Antes da extração os isolados foram preparados por meio da inoculação de 100 µl da cultura congelada em tubos contendo 5 mL de caldo BHI, incubados a 37 °C / 24h, e posteriormente estriados em PCA.

Extração do DNA: Foram ressuspensas de 3 a 5 colônias em 500 µL de água ultra-pura esterilizada. A suspensão foi fervida a 100 °C por 10 minutos e centrifugada por 2 minutos a 13.000 g. O sobrenadante (150 µL) foi recolhido e transferido para um novo microtubo.

Condições da PCR: Para a reação em cadeia da polimerase foram preparadas soluções de 25 µL contendo: 2,5 µL de tampão 10x (Sigma[®]); 0,5 µL de dNTP (concentração de 2,5 mM de cada dNTP), 1 µL de cada oligonucleotídeo; 0,2 µL de Taq polimerase (5U / µL) (Sigma[®]); 3 µL do DNA e o volume foi completado com água ultra-pura esterilizada. O par de oligonucleotídeos utilizados foi ST11 (AGCCAACCATGCTA AATTGGCGCA) e ST15 (GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG), com capacidade de amplificar um fragmento de 429 pb específico para o gênero *Salmonella* (Aabo et al., 1993). Como controle positivo foram utilizadas duas cepas de *Salmonella* (*S. enterica* sorovar Enteritidis ATCC 14028 e *S. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 13076), para controle negativo foi utilizada uma cepa de *E. coli* (EPEC) O86: H35.

O material foi amplificado em um termociclador (Axygen[®]) programado para uma desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de

desnaturação a 95 °C por 50 segundos, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (Sigma[®]) 1,2 % corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg / mL. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador 100 pb DNA Ladder (Promega[®]). A corrida de eletroforese foi realizada em cuba horizontal a 70 V / 1 hora em TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). A visualização foi realizada em um aparelho fotodocumentador (Quantum ST4[®]). Os resultados foram expressos na forma de presença e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de alface.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA NATURAL DA ALFACE CRESPA

A partir das análises realizadas, encontrou-se uma média das contagens de mesófilos aeróbios nas amostras de 6,81 log UFC.g⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3. Médias e desvio padrão da contagem (log UFC.g⁻¹) da microbiota presente em alface crespa

Microbiota	Média	DP* (±)
Contagem Total de aeróbios mesófilos	6,81	0,29
Fungos filamentosos e leveduras	4,06	0,60

*DP: Desvio padrão

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não determina limites de tolerância para contagem total de mesófilos, fungos filamentosos e leveduras para hortaliças *in natura*. Normalmente a contagem de aeróbios mesófilos mantem-se na faixa de 4 a 6 log UFC.g⁻¹, mas pode atingir contagens elevadas em torno de 9 log UFC.g⁻¹ (SANTOS; SILVA, 2010). Diversos fatores podem contribuir para uma elevada contagem de mesófilos, tais como, ambiente de cultivo, práticas adotadas durante a colheita e pós-colheita, forma de transporte, além da forma de armazenamento nos locais de comercialização.

Durante as coletas foi observado que a alface nos locais de venda não era armazenada sob refrigeração o que pode contribuir para o aumento da microbiota presente. Dessa forma o produto poderá chegar à casa do consumidor com uma quantidade elevada de micro-organismos, e os procedimentos normalmente utilizados para sanitização no ambiente doméstico podem não ser suficientes para promover uma redução da microbiota a valores não prejudiciais a saúde, podendo colocar em risco a saúde do consumidor.

Entre os locais de coleta a variação na contagem de mesófilos aeróbios não foi maior que um ciclo logarítimo. O maior valor de contagem verificado foi de 7,02 log UFC.g⁻¹ (local 5), e o menor foi de 6,65 log UFC.g⁻¹ (local 1) (Tabela 4). Os fungos filamentosos e leveduras apresentaram contagens menores do que as bactérias mesófilas aeróbias. A média das contagens variou de 3,73 a 4,43 log UFC.g⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4. Médias e desvio padrão da contagem (log UFC.g⁻¹) da microbiota presente em alface crespa nos locais de coleta

Locais de coleta	Microbiota (média ± DP)	
	Contagem Total de aeróbios mesófilos	Fungos filamentosos e leveduras
1	6,65 ± 0,27	4,17 ± 0,77
2	6,66 ± 0,26	3,73 ± 0,36
3	6,75 ± 0,29	3,76 ± 0,10
4	6,69 ± 0,35	4,16 ± 0,79
5	7,02 ± 0,34	3,89 ± 0,19
6	6,83 ± 0,24	4,05 ± 0,48
7	6,75 ± 0,32	4,18 ± 0,68
8	6,93 ± 0,22	4,40 ± 0,69
9	6,80 ± 0,32	4,07 ± 0,26
10	6,85 ± 0,28	4,43 ± 0,06
11	6,87 ± 0,17	3,93 ± 0,41

*DP: Desvio padrão

Em alguns locais de coleta, a alface ficava disponível para comercialização durante dois dias, e nem sempre era armazenada sob refrigeração. Segundo a maioria dos comerciantes a hortaliça era transportada até os pontos de venda por meio de caminhões fechados, e a maioria não conhecia os locais onde a alface era produzida. Os comerciantes também relataram não receber orientações por parte da Vigilância Sanitária do município, sobre a forma correta do armazenamento e comercialização das hortaliças.

De acordo com os resultados obtidos na ANOVA (Tabela 5), com relação à contagem de mesófilos aeróbios, não existe diferença significativa ao nível de 5 % de significância, entre os locais de coleta avaliados (Figura 1).

Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA), da contagem de mesófilos aeróbios em alface crespa

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Teste F	p
Local	10	0,852	0,085	1,02 ^{ns}	0,444348
Resíduo	49	4,112	0,084		
Total	59	4,964			

^{ns}: não significativo a 5 % de significância ($p > 0,05$);

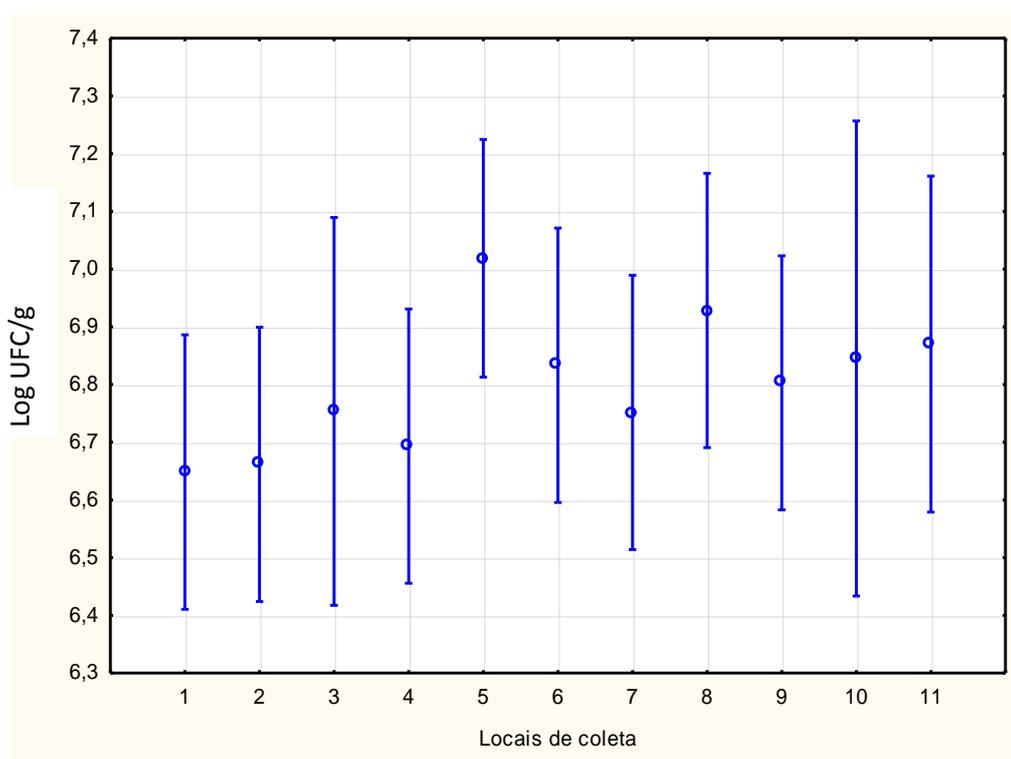


Figura 1 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônia por grama de alface (UFC/g), referente à análise de mesófilos aeróbios, para os diferentes locais de coletas. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95 % de probabilidade para a média de cada local de coleta.

A contagem de mesófilos não está diretamente relacionada com a presença de patógenos e toxinas. Porém, uma alta contagem de mesófilos pode ser um indicador de condições insatisfatórias durante a produção dos alimentos, e também que o produto foi mantido em condições que poderiam permitir a multiplicação de patógenos caso estes estivessem presentes (MORTON, 2001; MACEDO, 2012). As características visuais das hortaliças são um importante critério no momento da compra e as contagens microbianas, que podem provocar alterações sensoriais, estão em torno de 7 e 8 log UFC.g⁻¹. No entanto valores acima desses limites podem não resultar em alterações visuais (RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE et al., 2007).

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com amostras de alface, avaliadas durante a entrega em restaurantes de Viçosa-MG, com variação na contagem de mesófilos entre 6,7 e 7,4 log UFC.g⁻¹ (ANTUNES, 2009). Em uma análise da qualidade microbiológica de alface de cultivo convencional na cidade de Araraquara-SP, o resultado da contagem de mesófilos da maioria das amostras ficou entre 6 e 7 log UFC.g⁻¹ (MAFFEI; SILVEIRA; CATANOZI, 2013). Mesmo amostras de alface minimamente processada, que passam por processo de sanitização apresentam alta contagem de mesófilos, aproximadamente 6 log UFC.g⁻¹, no final do processamento (CRUZ; CENCI; MAIA, 2008; ABADIAS, et al., 2008).

Embora as leveduras e fungos filamentosos estejam mais associados com a deterioração de alimentos, algumas espécies isoladas de hortaliças frescas e minimamente processadas podem produzir micotoxinas colocando em risco a saúde do consumidor (TOURNAS, 2005; ABADIAS, 2008). Seow et al. (2012) observaram uma variação na contagem de fungos e leveduras entre 3,2 e 5,2 log UFC.g⁻¹ em amostras de alface coletadas no comércio de Cingapura. A partir da análise de amostras de cultivo convencional na Espanha, verificou-se uma contagem de média de fungos de leveduras de 4,21 log UFC.g⁻¹ (OLIVEIRA, et al., 2010).

Segundo os resultados obtidos na ANOVA (Tabela 6) não existe diferença significativa ao nível de 5 % de significância, com relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras, entre os locais de coleta avaliados (Figura 2).

Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA), da contagem de fungos filamentosos e leveduras em alface crespa

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Teste F	p
Local	10	2,3768	0,2377	0,617 ^{ns}	0,791804
Resíduo	49	18,8718	0,3851		
Total	59	21,2486			

^{ns}: não significativo a 5 % de significância ($p > 0,05$);

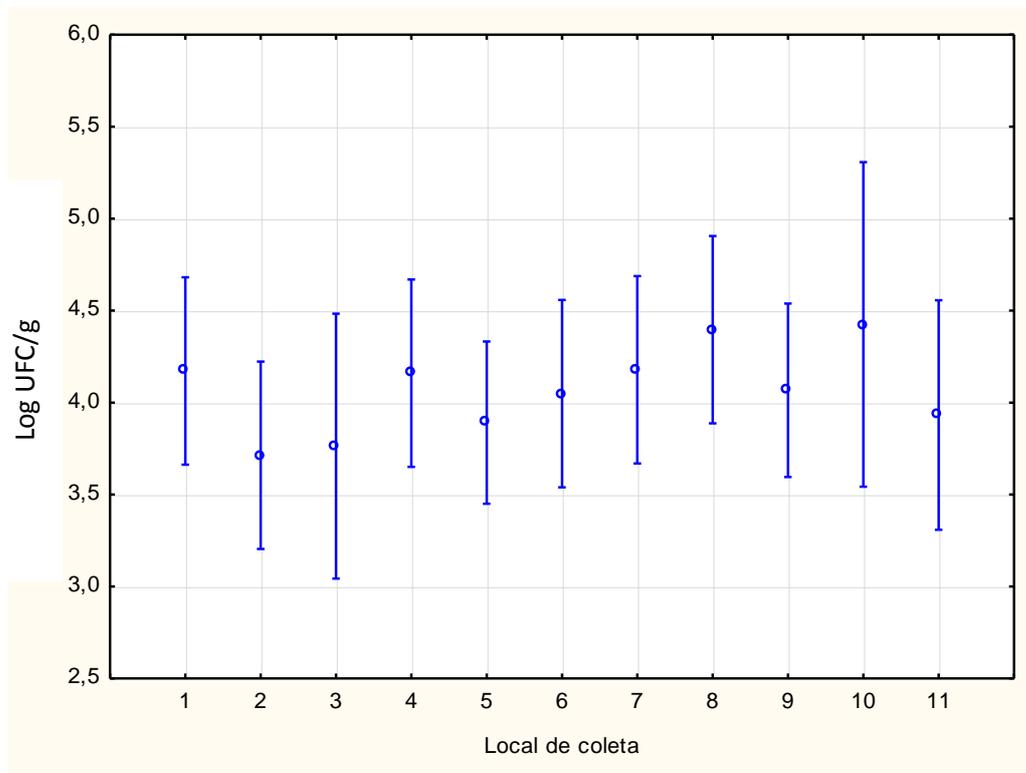


Figura 2 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônia por grama de alface (UFC/g), referente à análise de fungos filamentosos e leveduras, para os diferentes locais de coletas. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95 % de probabilidade para a média de cada local de coleta.

Foi constatada a presença de coliformes totais em 100 % das amostras, sendo que 12 % delas apresentaram uma concentração de $2,4 \times 10^2$ NMP g^{-1} , 15 % de $1,1 \times 10^3$ NMP g^{-1} e 73 % superior a $1,1 \times 10^3$ NMP/g (Tabela 7). Com relação aos coliformes termotolerantes 58 % das amostras apresentaram valores < 3 NMP g^{-1} , 30 % valores entre 4 e 21 NMP g^{-1} , e 12 % valores entre 43 e 93 NMP g^{-1} (Tabela 8).

Tabela 7. Resultado das análises de coliformes totais em amostras de alface crespa expressos em NMP. g⁻¹

	Repetições								Intervalo dos resultados (NMP.g ⁻¹)	n
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Local de coleta										
1	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	-	-	1,1 x 10 ³ -> 1,1 x 10 ³	6
2	1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ²	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ²	-	-	2,4 x 10 ² -> 1,1 x 10 ³	6
3	> 1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	-	-	-	-	-	1,1 x 10 ³ -> 1,1 x 10 ³	3
4	> 1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	-	-	1,1 x 10 ³ -> 1,1 x 10 ³	6
5	> 1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ²	> 1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ² -> 1,1 x 10 ³	8					
6	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ²	-	-	2,4 x 10 ² -> 1,1 x 10 ³	6
7	> 1,1 x 10 ³	-	-	> 1,1 x 10 ³	6					
8	> 1,1 x 10 ³	-	-	> 1,1 x 10 ³	6					
9	2,4 x 10 ²	1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ²	> 1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ²	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	-	2,4 x 10 ² -> 1,1 x 10 ³	7
10	> 1,1 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	-	-	-	-	-	-	> 1,1 x 10 ³	2
11	> 1,1 x 10 ³	-	-	-	-	> 1,1 x 10 ³	4			
Total de amostras										60

Tabela 8. Resultado da análise de coliformes termotolerantes em amostras de alface crespa expressos em NMP. g⁻¹

	Repetições								Intervalo dos resultados (NMP.g ⁻¹)	n
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Local de coleta										
1	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	-	-	< 3	6
2	< 3	< 3	< 3	9	4	9	-	-	< 3	6
3	< 3	< 3	93	-	-	-	-	-	< 3	3
4	< 3	< 3	9	4	93	< 3	-	-	< 3	6
5	< 3	< 3	7	15	< 3	< 3	< 3	-	< 3	8
6	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	-	-	< 3	6
7	< 3	< 3	< 3	9	43	7	-	-	< 3	6
8	21	4	75	7	< 3	9	-	-	< 3	6
9	< 3	15	1,1 x 10 ³	21	< 3	< 3	7	-	< 3	7
10	< 3	< 3	-	-	-	-	-	-	< 3	2
11	93	< 3	75	21	-	-	-	-	< 3	4
Total de amostras										60

Hortaliças comercializadas em Recife, também tiveram a presença de coliformes totais detectada em 100 % das amostras (SILVA; ANDRADE; STAMFORD, 2005). Durante a determinação de coliformes totais em amostras de alface na cidade de Araraquara-SP, a média da contaminação foi de $1,0 \times 10^3$ NMP g^{-1} (BONILHA, 1992).

Santos et al. (2010) encontraram para amostras de alface de cultivo convencional, comercializadas em Botucatu-SP, uma contaminação de $1,1 \times 10^3$ NMP g^{-1} para coliformes termotolerantes. Por meio da análise microbiológica de amostras de alface de diferentes variedades e sistemas de cultivo, comercializadas em hipermercados da cidade de João Pessoa, verificou-se que em todas as amostras avaliadas foram encontrado coliformes termotolerantes (NETO et al., 2012)

A relação direta entre coliformes e a contaminação de origem fecal não é correta, uma vez que, algumas bactérias presentes normalmente nos vegetais, que não tem como habitat primário o intestino humano e de animais, fazem parte desse grupo de micro-organismos (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

No entanto, é importante fazer a caracterização da microbiota presente naturalmente nas hortaliças, como forma de estabelecer sua relação com os patógenos que podem estar presentes. Por meio dos resultados de um estudo desenvolvido por Macedo et al. (2012), foi verificado que a microbiota natural de alface crespa pode influenciar na adesão de *Salmonella* Enteritidis nas folhas da hortaliça, sendo observado que a microbiota nativa pode ter propriedades inibitórias contra a adesão de patógenos.

4.2. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Salmonella* spp. EM ALFACE CRESPA

No presente estudo foram encontradas colônias suspeitas de *Salmonella* spp., em 98,33 % (n= 59) das amostras avaliadas, quando utilizado o plaqueamento diferencial por meio dos meios seletivos: Hektoen Entérico[®], (Figura 4), Ágar *Salmonella* Diferencial Modificado[®] (Figura 5), e BPLS[®] (Figura 6). Foram consideradas como suspeitas as colônias com características típicas em pelo menos um dos meios de cultura utilizados.

Salmonella spp. está entre os patógenos quem têm sido identificados em hortaliças folhosas, principalmente na alface (SANTOS et al., 2010). Em relação às hortaliças *in natura*, a legislação brasileira determina padrões microbiológicos apenas para *Salmonella* spp., determinando ausência deste micro-organismo em 25 g do produto (BRASIL, 2001). Nos últimos anos tem aumentado os relatos e estudos da contaminação de produtos de origem vegetal por *Salmonella* spp., além disso, tem-se verificado um aumento nos surtos alimentares associados a esses produtos.

A composição dos alimentos, bem como, a microbiota acompanhante pode influenciar o resultado do isolamento de *Salmonella* spp. realizado em meios seletivos (BUSSE, 1995). Um bom meio de isolamento é aquele com elevado grau de sensibilidade e especificidade. Dependendo da seletividade dos meios utilizados no isolamento de *Salmonella* spp. outras bactérias como os gêneros *Citrobacter*, *Proteus* podem aparecer como colônias presuntivas deste micro-organismo, uma vez que, que são lactose negativas e sulfeto positivas, assim como a *Salmonella* spp., o que pode levar a resultados falso positivos quando são utilizados os meios comercialmente disponíveis. (RAMBACH, 1990; RALL et al., 2005; CARRIQUE-MAS et al., 2009). Além disso, colônias atípicas que não apresentam características de *Samonella* spp. nos meios de cultivo comumente utilizados, podem ser descartadas quando utilizada a metodologia convencional (BENNETT et al., 1998).

Pela técnica de PCR 21,66 % das amostras (n = 13) foram consideradas como positivas para *Salmonella* spp. (Figura 7), podendo ser consideradas como produtos em condições sanitárias insatisfatórias de acordo com os padrões microbiológicos da legislação vigente. As amostras positivas foram provenientes de oito dos onze pontos de coleta.

Durante a avaliação da contaminação de hortaliças na Turquia, Aytac e colaboradores (2010) por meio da técnica de PCR detectaram a presença de *Salmonella* spp. em 14,0 % das amostras de alface. A presença de *Salmonella* spp. foi verificada em 20 % das amostras de alface orgânica analisadas por Arbos (2010). Durante a avaliação microbiológica de hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto-SP, 9 % dos estabelecimentos avaliados apresentaram hortaliças contaminadas por *Salmonella* spp. (TAKAYANAGUI, 2000). Abadias et al. (2008) durante a investigação da qualidade microbiológica de hortaliças

comercializadas na Espanha encontraram *Salmonella* spp. em 1,3% das amostras.

Estudos demonstram uma boa especificidade e sensibilidade dos métodos moleculares ao serem comparados com os métodos convencionais e para identificação de *Salmonella* spp. Em um estudo realizado, para avaliar a eficiência de um método molecular (sistema BAX[®]) em relação à metodologia oficial adotada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para identificação de *Salmonella* spp. em carne de frango, verificou-se que a sensibilidade e especificidade do método molecular foram de 100 % e 92,3 % respectivamente (FRAUSTO; ALVES; OLIVEIRA, 2013). Durante a avaliação de três métodos para determinação de *Salmonella* em carcaças de frango verificou-se que a PCR e o método de imunoanálise foram mais sensíveis, rápidos e práticos em relação ao método convencional (RÜCKERT, et al., 2008).

As metodologias tradicionais para determinação de micro-organismos em alimentos são consideradas como métodos oficiais por diversos órgãos. No entanto, as metodologias convencionais podem ser demoradas e trabalhosas, além de serem mais propensas a gerar resultados falso positivos. Isso pode levar a uma carga de trabalho desnecessária e aumentos no custo associado aos testes. Dessa forma a técnica de PCR tem se mostrada promissora, pois além de ser mais rápida, seus resultados não estão relacionados com características bioquímicas nas quais se baseiam os métodos tradicionais, o que pode reduzir os resultados falso positivos.

As boas práticas agrícolas devem ser adotadas de forma a garantir a produção de hortaliças seguras do ponto de vista microbiológico, mas vale ressaltar que somente elas não garantem a qualidade higiênico-sanitária durante todo o processo de distribuição, até a chegada a mesa do consumidor. Mesmo com o avanço das tecnologias que pretendem garantir a produção de alimentos mais seguros, a educação do produtor e do manipulador de alimentos é uma medida simples que pode auxiliar na redução das DTAs.

Foi verificada ausência de trabalhos sobre a contaminação de hortaliças no estado do Espírito Santo para comparação dos resultados determinados no presente estudo. Isso demonstra a necessidade da realização de mais trabalhos relacionados a este tema nesta região.

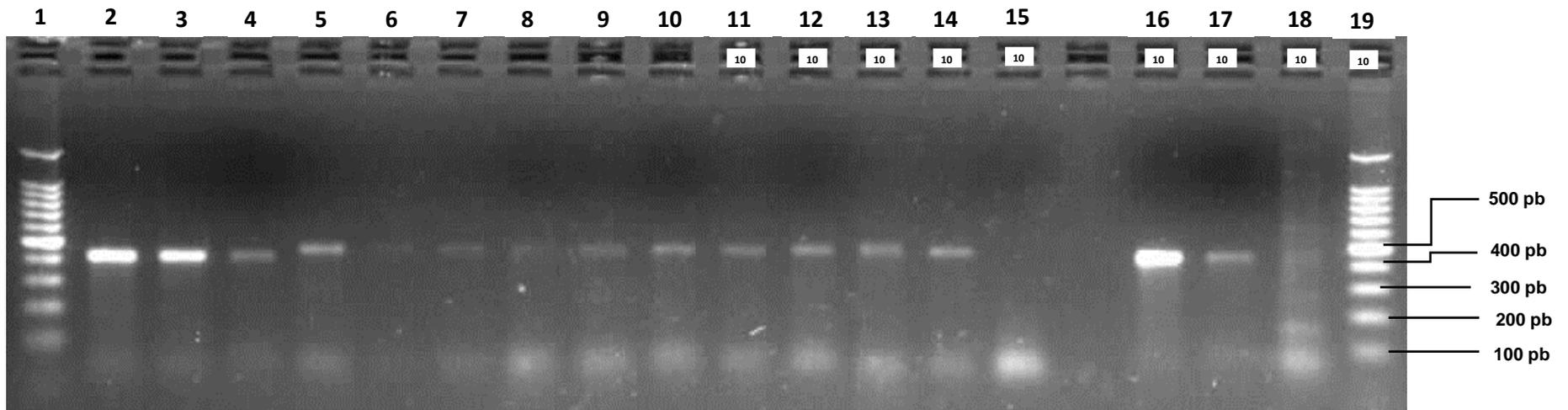


Figura 7 – Produtos da amplificação obtidos da reação de PCR separados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídeo. Marcador 100pb DNA Ladder (1 e 19); produto da amplificação a partir do DNA de *S. enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 13076) e *S. enterica* sorovar Enteritidis (ATCC 14028) como controle positivo (16 e 17); produto da amplificação da reação de PCR sem amostra de DNA (15); produto da amplificação a partir de DNA de *E. coli* (EPEC) O86: H35 como controle negativo (18); produto da amplificação a partir do DNA das colônias isoladas das amostras de alface (2 a 14).

5. CONCLUSÕES

Todas as amostras avaliadas no presente estudo apresentaram coliformes totais. No entanto, uma vez que, esse grupo de micro-organismos faz parte da microbiota natural das hortaliças sua presença não necessariamente indica contaminação fecal, mas pode indicar condições de manejo inadequadas. Com relação aos coliformes termotolerantes a maioria das amostras (58 %) apresentaram valores $< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$.

Pela técnica de PCR foi determinada a ocorrência de *Salmonella* spp. em 21,66 % das amostras de alface (n=13), o que não está em de acordo com a legislação vigente, uma vez que esta determina ausência desse micro-organismo em 25g de produto. Essas amostras foram provenientes de oito dos 11 estabelecimentos avaliados. A contaminação de hortaliças por *Salmonella* spp. pode ter diversas origens, tais como, o tipo de adubação utilizada, a origem da água de irrigação e até mesmo manipuladores que podem ser portadores assintomáticos deste micro-organismo, além das práticas adotadas após a colheita.

A presença de *Salmonella* spp. em amostras de alface analisadas neste trabalho pode representar riscos à saúde do consumidor. São necessários mais estudos que possam verificar a possível origem da contaminação da alface por *Salmonella* spp. Desse modo torna-se importante a adoção de medidas preventivas para reduzir a contaminação da alface *in natura* e demais hortaliças ao longo de toda cadeia produtiva, como uma forma de reduzir os riscos à saúde associados ao consumo deste alimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S.; RASMUSSEM, O. F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P. D.; OLSEN, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 171-178, 1993.

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 121–129, 2008.

ACKERS, M. L.; MAHON, B. E.; LEAHY, E.; GOODE, B.; DAMROW, T.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; RICE, D. H.; BARRETT, T. J.; HUTWAGNER, L.; GRIFFIN, P. M.; SLUTSKER, L. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, n.6, p. 1588-1593, 1998.

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K. M. P.; VIDOTTO, M. C.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp isolados de carcaças de frango por REP E ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 414-420, 2006

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, nov./dez., p. 1139-1145, 2006.

ANDREWS, W. H.; FLOWERS, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 357-380.

ANTUNES, M. A. **Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos na cadeia de produção de alface (*Lactuca sativa* L.) variedade vitória de santo antão**. 2009. 199f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ARAÚJO, E. M; MENEZES, H. C. Estudo de fibras alimentares em frutas e hortaliças para uso em nutrição enteral ou oral. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p 42-47, maio, 2007.

ARBOS, K. A. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30(Supl.1), p. 215-220, maio, 2010.

AYTAC, S. A.; BEN, U.; CENGIZ, C.; TABAN, B. M. Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, n. 2, p. 275-279, 2010.

BECHAUT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 413–423, 2002.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology**, v.12, n. 9, p. 2385–2397, 2010.

BENNETT, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNAT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 437-441, 1998.

BEZERRA, C. Alface transgênico pode ajudar no diagnóstico de dengue . 2011. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2011/outubro/2a-semana/alface-transgenico-pode-ajudar-no-diagnostico-de-dengue#>> Acesso em: 21/07/2013.

BEZERRA, C. Embrapa desenvolve plantas de alface com maior teor de ácido fólico. 2012. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/novembro/3a-semana/embrapa-desenvolve-plantas-de-alface-com-maior-teor-de-acido-folico/#> >. Acesso em: 21/07/2013.

BONILHA, P. R. M. Comparação das condições sanitárias entre as alfaces cultivadas e comercializadas na cidade de Araraquara – SP. **Alimentos e Nutrição**, v. 4, p. 125-130, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.html>. Acesso em: 20 de julho de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição** / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, **Departamento de Análise de Situação em Saúde. Análise da situação das**

doenças transmissíveis no Brasil no período de 2000 a 2010. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação:** Espírito Santo / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira:** promovendo a alimentação saudável. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: 2006. 210p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico: vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 - 2004/** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Ano 5, n. 6 – Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. LEI nº- 11.947, de 16 de junho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar e do Programa Dinheiro Direto na Escola aos alunos da educação básica e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 jun. 2009. Seção 1. p. 2.

BRACKETT, R. E.; SPLITTSTOESSER, D. F. Fruits and Vegetables. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 515-520.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 23, p. 89-103, 1995.

BUSSE, M. Media for *Salmonella*. **International Journal Food Microbiology**, v.26, p. 117-131, 1995

CARRIQUE-MAS, J. J.; BARNES, S.; MacLAREN, I.; DAVIES, R. Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D). **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1976–1983, 2009.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report** , v. 62, n. 15., p. 283-287, 2013.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Salmonella**. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>. Acesso em: 20 jul. 2013.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. **Estimates of Foodborne Illness in the United States**. 2013a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. Acesso em: 21 jul 2013.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n.22, p. 749-755, 2011.

CRUZ, A. G.; CENCI, S. A.; MAIA, M. C. A. Microbiological hazards involved in fresh-cut lettuce processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1455–1463, 2008.

DeWAAL, C. S.; GLASSMAN, M. Outbreak alert 2001-2010 A review of foodborne illness in America. CSPI: Center For Science in the Public Interest, 2013. 17p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Catálogo brasileiro de hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no país**. Brasília: Embrapa hortaliças, 2010. 60p.

ELIZACUÍVE, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, v. 25, p. 704-708, 2012.

EVANCHO, G. M. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, P. F.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p.25-35.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2008a. **Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report**. Microbiological Risk Assessment Series No. 14. Rome. 151p.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2008b. **Benefits and Risks of the Use of Chlorine-containing Disinfectants in Food Production and Food Processing: report of a joint FAO/WHO expert meeting**. Michigan. 288p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ed. Viçosa: UFV, 2008. 421p.

FDA – Food and Drug Administration. Bad Bug Book Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2. ed. 2012. 292p.

FORTES, T. P.; FAGUNDES, M. Q.; VASCONCELLOS, F. A.; TIMM, C. D.; SILVA, E. F. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 219-27, 2012.

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

FRANZ, E.; SEMENOV, A. V.; TERMORSHUIZEN, A. J.; VOS, O. J.; BOKHORST, J. G.; BRUGGEN, A. H. C. Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 313-327, 2008.

FRAUSTO, H. S. E. G.; ALVES, J.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Evaluation of the BAX® system for the detection of *Salmonella* spp. in naturally contaminated chicken meat. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 33, n. 3, jul-set, 2013.

GOULD, L. H.; WALSH, K. A.; VIEIRA, A. R.; HERMAN, K. WILLIAMS, I T.; HALL, A. J.; COLE, D. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1998–2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report** , v. 62, n. 2., p. 283-287, 2013.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, 9 ed., 2007.

HARRIS, L. J.; FARBER, J.N; BEUCHAUT. L. R.; PARISH, M. E.; SUSLOW, T. V.; GARRETT, E. H.; BUSTA, F. F. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, cap. 3, v.2, p.161-173, 2003.

HARRIS, L. J.; GRIFFITHS, M. W. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR). **Food Research International**, v. 25, p. 457-469, 1992.

HEATON, J. C.; JONES, K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 613–626, 2007.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Antigenic Formulae Of The *Salmonella* Serovars**. ed. 9. 2007

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006**: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro: IBGE, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: Despesas, rendimentos e condições de vida Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro: IBGE, 2010a. 222p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: Aquisição domiciliar per capita Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro: IBGE, 2010b. 282p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUNEJA, V. K.; HUANG, L.; YAN, X. Thermal inactivation of foodborne pathogens and the USDA pathogen modeling program. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 191–198, 2011.

KIM, H.; CHO, J. Simple and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in fruit juice by real-time PCR without enrichment culture. **Food Control**, v. 21, p. 1419 - 1423, 2010.

KROUPITSK, Y.; PINTO, R.; BELAUSOV, E.; SELA, S. Distribution of *Salmonella* typhimurium in romaine lettuce leaves. **Food Microbiology**. v. 28, p. 990-997, 2011.

LANTZ, P. G.; HÄGERDAL, B. H.; RADSTROM, P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, 1994.

LEE, M. B.; GREIG, J. D. A Review of Gastrointestinal Outbreaks in Schools: Effective Infection Control Interventions. **Journal of School Health**, v. 80, n. 12, p. 588-598, 2010.

LÖFSTRÖM, C.; HOORFAR, J.; SCHELIN, J.; RADSTRÖM, P.; MALORNY, B. *Salmonella*. In: LIU, D. **Molecular detection of foodborne pathogens**, p. 447 – 458, 2010.

LIU, C.; HOFSTRA, N.; FRANZ, E. Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 119-128, 2013.

MACEDO, P. L.; SÃO JOSÉ, J. F. B; ANDRADE, N. J.; PIRES, A. C. S.; FERREIRA, S. O. Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of *Salmonella* Enteritidis. **Food Control**, 2012.

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

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, p. 86–97, 2006.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 14, n 3, p. 219-224, set./dez., 2001.

MALORNYA, B. et al. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 241– 249, 2003.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBROEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiol**, v. 83, p. 39-48, 2003.

MATSUI, T.; SUZUKI, S.; TAKAHASHI, H.; OHYAMA, T.; KOBAYASHI, J.; IZUMIYA, H.; WATANABE, H.; KASUGA, F.; KIJIMA, H.; SHIBATA, K.; OKABE, N. *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p 873-879, 2004.

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

MORETTI, C. L. MATOS, L. M. Processamento mínimo de alface crespa. Brasília: Embrapa hortaliças, 2005. (Comunicado Técnico 25).

MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 63-68

NACMCF. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. **Food Control**, v. 10, p. 117 -143, 1999.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação e Nutrição. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4.ed. rev e ampl. Campinas: Nepa-Unicamp, 2011.

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

NICOLLE, C.; CARDINAULT, N.; GUEUX, E.; JAFFRELO, L.; ROCK, E.; MAZUR, A.; AMOUROUXA, P.; RÉMÉSY, C. Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. **Clinical Nutrition**, v. 23, p 605-614, 2004.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J. V. D., KRUSE, H. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S3-S15, 2010.

NUORTI, J. P.; NISKANEN, T.; HALLANVUO, S.; MIKKOLA, J.; KELA, E.; HATAKKA, M.; FREDERIKSSON-AHOMAA, M.; LYYTIKÄINEN, O.; SIITONEN, A.; KORKEALA, H. RUUTU, P. A Widespread Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 Infection from Iceberg Lettuce. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 5, p. 766-774, 2004.

OLIVEIRA, M. N.; BRASIL, A. L. D.; TADDEI, J. A. A. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das cozinhas de creches públicas e filantrópicas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 3, p. 1051-1060, 2008.

OLSEN, J. E.; AABO, S.; HILL, W.; NOTERMANS, S.; WERNARS, K.; GRANUM, P. E.; POPOVIC, T.; RASMUSSENA, H. N.; OLSVIK, O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 1-78, 1995.

OMAF – Ministry Agriculture of Food. **Food Safety Risk Assessment: Foods of Plant Origin. Lettuce Risk Assessment Introduction and Summary.** Otario, 2001. Disponível em: <
http://www.omafra.gov.on.ca/english/food/inspection/fruitveg/risk_assessment_pdf/lettuce/30ra.pdf>. Acesso em : 21 de julho de 2013.

O'GRADY, J.; RUTTLEDGE, M.; SEDANO-BALBA, S. SMITH, T. J.; BARRY, T.; MAHER, M. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 26, p. 4 – 7, 2009.

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.

OSMAN, K. M.; GIRH, Z. M. S. A.; BAKRY, M. A.; ELSAFTY, M. M. Identification of the *Salmonella* genes *Yafd* and *Xtha*: A step into the control of *Salmonella* food poisoning associated with consumption of eggs in egypt. **Global Veterinaria**, v. 7, n. 6, p. 625-631, 2011

PAINTER, J. A.; HOEKSTRA, R. M.; TRACY, A.; TAUXE, R. V.; BRADEN, C. R.; ANGULO, F. J.; GRIFFIN, P. M. Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data,

United States, 1998 –2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, mar, 2013.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRET, E. H. FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, cap. 5, v.2, p.161-173, 2003.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; MALORNY, B.; GROUT, J.; HOORFAR, J.; FACH, P. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 409–420, 2004.

PHAC. Public Health Agency of Canada. **Estimates of Food-borne Illness in Canada**. 2013. Disponível em: < <http://www.phac-aspc.gc.ca/efwd-emoha/efbi-emoa-eng.php> >. Acesso, em 01/07/2013.

PRUITT, K. M.; KAMAU, D. N. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 221-231, 1993.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSEON, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.

RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 185–194, 2007

RALL, V. L. M.; RALL, R.; ARAGON, L. C.; SILVA, M. G. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 147-150, 2005

RAMBACH, A. New Plate Medium for Facilitated Differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and Other Enteric Bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 1, p. 301-303, 1990.

RISSATO, D. P.; BORGIO, A. P.; MOREIRA, J. P.; BAPTISTA, F.; CONTI, A. C. M.; RIBEIRO, A. B. Detecção de *Salmonella* spp. em água de lavagem de carcaças de frango utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 35-39, jan./abr. 2011.

ROEVER, C. De. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. **Food Control**, v. 9, n. 6, p. 321-347, 1998.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 81, p. 501-508, 1996.

RYDER, E. J. The New Salad Crop Revolution. In: Janick J. Whipkey A. **Trends in new crops and new uses**. ed 5. P. 408 – 412, 2002.

RÜCKERT, D. A. S.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; MORAES, M. P.; JUNIOR, A. S.; NERO, L. S. Assessment of conventional detection method, immunoanalysis and polymerase chain reaction for salmonella spp. monitoring in chicken. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 16, p. 185–195, 2008

SAEG – **Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1**. Fundação Arthur Bernardes. UFV. Viçosa, 2007.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p 187-194, abr. - jun. 2012.

SANT'ANA, A. S. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology** , v. 28, p 1235-1237, 2011.

SANTOS, T. B. A.; SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; PEREIRA, J. L. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal of Food and Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 141-146, 2010.

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. Rev. **Revista iberoamericana de tecnología postcosecha**, v. 11, n.1, p. 67-74, 2010.

SÃO JOSÉ, J.F. B.; VANETTI, M.C. D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v. 24, p. 95-99, 2012.

SAPERS, G. M. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products, **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 305–311, 2001.

SCF. Scientific Committee on Food. **Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw, Report of the Scientific Committee on Food**. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 29 April 2002.

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

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. M. *Salmonella* spp, importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H. SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 3. ed. 2007.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitários em serviços de alimentação**. 6. Ed. São Paulo: Varela, 2007. 625p.

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**, Campinas, v. 26, n.2, p.352-359, 2006.

SILVA, C. G. M.; ANDRADE, S. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Ocorrência de *Cryptosporidium spp.* e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Ciências & Saúde coletiva**, v. 10, p. 63-69, 2005.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* 0157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p. 167-173, 2003.

SMITH, S. et al. Molecular characterization of *Salmonella* spp directly from snack and food commonly sold in lagos, Nigeria. **Research Note**, v. 43, n. 3, p. 718-723, 2012.

TAKAYANAGUI, O. M.; OLIVEIRA, C. D.; BERGAMINI, A. M. M.; CAPUANO, D. M.; OKINOS, 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. Análise da cadeia de produção de verduras em Ribeirão Preto, SP. **Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Ribeirão Preto, v. 39, n.2, p. 224-226, 2000.

TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 71– 77, 2005.

THOMAS, M. K.; MURRAY, R.; FLOCKHART, L. PINTAR, K.; FAZIL, A.; NESBITT, A.; MARSHALL, B. Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 10, n. 3, p. 639-648, 2013.

VRIES, I. M. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 44, p. 165-174, 2007.

WHO. World Health Organization. **Documento informativo para o Workshop de Lisboa sobre a Promoção de Hortofrutícolas nos Países de Expressão Portuguesa**. Lisboa: 2006. 31p.

WHO/FAO. World Health Organization. Food And Agriculture Organization Of The United Nations The United. **Diet, Nutrition and the Prevention of**

Chronic Diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva, 2003. (WHO technical report series, 916)

WHO. World Health Organization. **The World Health Report 2002:** Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva: 2002. 230p.

WHO. World Health Organization. **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw:** a review. Geneva, 1998. 42p.