

WEMERSON GERALDO MAGALHÃES

**CRESCIMENTO E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALFACE
CULTIVADA COM SOLUÇÕES DE URINA DE VACA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M188c
2013

Magalhães, Wemerson Geraldo, 1975-
Crescimento e qualidade microbiológica de alface cultivada
com soluções de urina de vaca / Wemerson Geraldo Magalhães.
– Viçosa, MG, 2013.
xi, 94 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices:

Orientador: Mário Puiatti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 84-86.

1. Alface - Nutrição. 2. Lactuca sativa. 3. Agricultura
orgânica. 4. Micro-organismos. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 635.52

WEMERSON GERALDO MAGALHÃES

**CRESCIMENTO E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALFACE
CULTIVADA COM SOLUÇÕES DE URINA DE VACA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 04 de dezembro de 2013.

Vicente Wagner Dias Casali

Maria Aparecida Nogueira Sediama

Luiz Antônio Santos Dias
(Co-orientador)

João Tomaz da Silva Borges

Mário Puiatti
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço especialmente à CAPES, ao IFMG – *Campus* São João Evangelista, ao Departamento de Fitotecnia da UFV, e ao meu orientador Professor Mário Puiatti.

BIOGRAFIA

Wemerson Geraldo Magalhães nasceu em 01 de outubro de 1975, em Guanhães, Minas Gerais. Iniciou sua carreira de docente em 1998 como professor substituto da UFRRJ. Em 1999 tornou-se professor do CTUR (Colégio Técnico da UFRRJ). Desde 2005 leciona no IFMG – *Campus São João Evangelista*.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Generalidades	10
3.2. Água de irrigação	11
3.3. Urina de vaca: coleta e análise	12
3.4. Preparo e aplicação das soluções de urina de vaca nos experimentos	15
3.5. Cultivo da alface	17
3.6. Características avaliadas nas plantas	20
3.7. Análises microbiológicas de alface não lavada	20
3.7.1. Análises microbiológicas de alface lavada apenas em água pura tratada	21
3.8. Análises estatísticas	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Qualidade da água de irrigação	23
4.2. Contaminantes nos recipientes	26
4.3. Contaminantes na urina de vaca	27
4.4. Contaminantes nas soluções de urina de vaca	32
4.4.1. Contaminantes nas soluções de urina de vaca utilizadas nos experimentos 1 e 2	32
4.4.2. Contaminantes nas soluções de urina de vaca utilizadas nos experimentos 3 e 4	36
4.5. Urina de vaca e a produção de alface	37
4.5.1. Massa de Matéria Fresca de Cabeça (MFCA)	38
4.5.2. Número de Folhas por Planta (NFP)	42
4.5.3. Massa de Matéria Fresca de Folhas (MFF)	46
4.5.4. Massa Fresca de Caule (MFC)	49
4.5.5. Comprimento de Caule (CC)	53
4.6. Análises microbiológicas da alface submetida à aplicação de soluções de urina de vaca	57
4.6.1. Coliformes Totais	57
4.6.2. Coliformes Termotolerantes	58
4.6.3. Micro-organismos Aeróbios Mesófilos	62
4.7. Higienização da alface no Município de São João Evangelista, Minas Gerais	67
4.8. Análise microbiológica da alface lavada e não lavada	70
4.8.1. Coliformes totais em alface lavada apenas em água pura	70
4.8.2. Coliformes termotolerantes em alface lavada apenas em água pura	71
4.8.3. Micro-organismos aeróbios mesófilos em alface lavada	71

apenas em água pura	75
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICE A	87

RESUMO

MAGALHÃES, Wemerson Geraldo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013. **Crescimento e qualidade microbiológica de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivada com soluções de urina de vaca.** Orientador: Mário Puiatti. Co-orientadores: Luiz Antônio dos Santos Dias e Fernando Luiz Finger.

A urina de vaca aplicada em alface (*Lactuca sativa* L.) tem promovido o seu crescimento e a produção de folhas. Todavia, questionamentos têm sido feitos em relação à contaminação microbiológica. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de soluções de urina de vaca sobre características de crescimento de planta e qualidade microbiológica da alface. Foram realizados quatro experimentos no IFMG – *Campus* São João Evangelista - MG. Os experimentos 1 e 2 foram desenvolvidos no período de novembro de 2011 a fevereiro de 2012 e os experimentos 3 e 4 no período de agosto a novembro de 2012. Os experimentos foram conduzidos em ambiente protegido e em sistema de cultivo orgânico. Os experimentos 1 e 2 foram constituídos de cinco tratamentos, correspondentes às concentrações de soluções de urina de vaca de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0%, conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. No experimento 1, a aplicação das soluções foi via foliar e no experimento 2 foi via solo, ambos com a alface 'Regina 2000'. Os experimentos 3 e 4 foram constituídos de cinco tratamentos, correspondentes às concentrações de soluções de 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10%, conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Em ambos, a aplicação das soluções foi via foliar. No experimento 3 a alface

foi a 'Regina 500' e no experimento 4 a alface foi 'Babá de Verão'. As soluções foram preparadas com a mesma água utilizada para irrigação, sendo que a testemunha recebeu somente água. Em todos os experimentos foram aplicados 60 mL de solução/planta. Esse volume foi dividido em cinco aplicações semanais, iniciando sete dias após transplante das mudas, aplicando-se, respectivamente, 5, 5, 10, 20 e 20 mL de solução/planta. A parcela foi constituída por quatro fileiras longitudinais de 1,75 m de comprimento, com plantas espaçadas de 0,25 x 0,25 m. Foram consideradas úteis, as seis plantas centrais das duas fileiras centrais. Foram avaliadas características de produção da alface e realizadas análises microbiológicas da água de irrigação, da urina de vaca armazenada, das soluções de urina de vaca aplicadas, da alface lavada e não lavada em água pura. Os dados qualitativos foram submetidos à análise de variância. Os dados referentes às concentrações das soluções foram submetidos à análise de regressão, utilizando-se o teste t, a 1% e a 5% de probabilidade. Soluções de urina de vaca aplicadas via foliar ou solo, na concentração de até 5,21%, promoveram o crescimento das plantas e a produção da alface. Soluções de urina de vaca aplicadas via solo, até a concentração de 4%, e via foliar até 10%, não promoveram aumento da carga microbiana em alface. A urina de vaca hermeticamente fechada em bombona plástica mantida no escuro apresentou crescimento dos micro-organismos coliformes totais, coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos até por volta da 5ª semana, caindo drasticamente e alcançando nível zero, ou próximo desse, na 7ª semana. A água de irrigação com elevada carga microbiana foi a maior responsável pela carga microbiana em alface, sendo que a simples lavagem das folhas de alface com água pura, apesar de reduzir a carga microbiana, não foi eficaz em reduzir essa carga até níveis aceitáveis aos comensais.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Wemerson Geraldo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2013. **Growth and microbiological quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in solutions with cow urine.** Adviser: Mário Puiatti. Co-advisers: Luiz Antônio dos Santos Dias e Fernando Luiz Finger.

The cow urine applied to lettuce (*Lactuca sativa* L.) has promoted the growth and production of leaves. However, questions have been raised regarding the microbiological contamination. The study aimed to evaluate the effect of solutions of cow urine on plant growth characteristics and microbiological quality of lettuce. Four experiments were conducted in IFMG - *Campus* São João Evangelista – MG. Experiments 1 and 2 were carried out from November 2011 to February 2012 and the experiments 3 and 4 in the period August to November 2012. The experiments were conducted in greenhouse under organic cropping system. Experiments 1 and 2 consisted of five treatments, corresponding to concentrations of cow urine solutions of 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0%, conducted in a completely randomized design with five replications. In experiment 1, the application of the solutions was foliar and in experiment 2 was in the soil, both with lettuce 'Regina 2000'. Experiments 3 and 4 were made up of five treatments, solutions corresponding to concentrations of 0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 10%, conducted in a completely randomized design with four replications. In both, the application of foliar solution was only in experiment 3 the lettuce was the 'Regina 500' and in experiment 4 Lettuce was 'Babá de Verão'. The solutions were prepared with the same water used for irrigation, and the control received only water. In all the

experiments were applied 60 mL of solution/plant. This volume was divided into five applications, starting seven days following transplantation of seedlings, applying respectively 5, 5, 10, 20 and 20 mL/plant. The plot consisted of four longitudinal rows of 1.75 m long, with plants spaced 0.25 x 0.25 m. The six central plants from the two central rows were considered useful. Were evaluated the production of lettuce and microbiological analysis of irrigation water, the cow urine stored, the solutions applied cow urine, lettuce washed and not washed in pure water. Qualitative data were subjected to analysis of variance. The data on the concentration of the solutions were subjected to regression analysis, using the t test, the 1% and 5% probability. Solutions cow urine applied foliar or soil, the concentration of up to 5.21%, promoted plant growth and yield of lettuce. Solutions cow urine applied to soil, up to a concentration of 4%, and foliar up to 10%, did not improve the microbial load in lettuce. The cow urine in sealed plastic bombona kept in the dark showed growth of microorganisms total coliforms, fecal coliforms and aerobic mesophilic until around the 5th week, dropping dramatically and reaching zero, or close to it, in the 7th week. The irrigation water had a high microbial load and was largely responsible for the microbial load on the lettuce, and the simple washing of lettuce leaves with pure water, although reducing the microbial load, was not effective for reducing this burden to acceptable levels for diners.

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.), hortaliça folhosa consumida crua, pertence a um grupo de alimentos de ampla aceitação popular. Ela participa quase diariamente da alimentação de grande parte da população, sendo que a demanda constante por essa hortaliça é atendida por inúmeros produtores rurais espalhados pelo país.

Até atingir o ponto comercial, a alface cumpre um ciclo de cultivo de algumas semanas. Nesse breve tempo, o crescimento da planta e a produção de folhas são beneficiados pela adubação orgânica. Nas pequenas propriedades rurais, além do cultivo de hortaliças, é comum a atividade da exploração de gado de leite, sendo o esterco produzido utilizado nesses cultivos.

Todavia, a urina da vaca, um subproduto da atividade leiteira, tem sido pouco utilizada. A sua utilização pode ser algo benéfico no cultivo de hortaliças, representando uma alternativa de baixo custo, acessível a inúmeros agricultores e com resultados satisfatórios para o crescimento da planta. Mas, além de favorecer o crescimento da planta, a urina de vaca tem de ser inócua, mantendo a hortaliça livre de qualquer risco microbiológico, pois a alface é consumida *in natura*.

Diante da importância econômica e alimentar da alface, e da possibilidade de seu cultivo no sistema orgânico, faz-se necessário verificar se a aplicação de urina de vaca pode favorecer o cultivo dessa hortaliça e que influência pode exercer sobre a taxa microbiana da planta.

Em razão do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de soluções de urina de vaca, via foliar e via solo, em

diferentes concentrações, sobre características de crescimento de planta e a qualidade microbiológica da alface cultivada em sistema orgânico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais cultivada e consumida em todo o planeta (RUBATZKY & YAMAGUCHI, 1997). A alface é cultivada em todas as regiões brasileiras e é a principal hortaliça consumida na forma de salada pela população, tanto pelo sabor e qualidade nutricional quanto pelo reduzido preço para o consumidor (RESENDE *et al.*, 2007).

A evolução de cultivares e sistemas de manejo, tratos culturais, irrigação, espaçamentos, técnicas de colheita e de conservação pós-colheita e mudanças nos hábitos de alimentação impulsionaram o cultivo e tornaram-na a hortaliça folhosa mais consumida no país (RESENDE *et al.*, 2007).

De acordo com LOPES *et al.* (2005), a alface é a hortaliça folhosa de maior valor comercial cultivada no Brasil, com cerca de 75 cultivares comerciais, das quais, aproximadamente 18 são nacionais; e é ingerida, com maior frequência, em saladas cruas e sanduíches, sendo mais consumida nas regiões Sul e Sudeste.

A larga adaptação da alface às condições climáticas diversas, a possibilidade de cultivos sucessivos no mesmo ano, o custo relativamente baixo de produção, a pouca suscetibilidade a pragas e doenças e a comercialização segura, fazem com que seja a hortaliça preferida pelos pequenos produtores (MEDEIROS *et al.*, 2007). Esse fato lhe confere grande importância econômica e social, sendo significativo fator de agregação do homem ao campo (VILLAS BÔAS *et al.*, 2004).

A alface é uma planta herbácea, delicada, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas são amplas e crescem em roseta, em

volta do caule, podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma “cabeça”, com coloração em vários tons de verde, ou roxa, conforme a cultivar (FILGUEIRA, 2003). Ainda segundo esse autor, a adubação orgânica é altamente benéfica a essa cultura, de raízes delicadas e exigente quanto ao aspecto físico do solo.

A alface possui de 95,0 a 97,2% de umidade; 0,6 a 1,7% de proteínas; 0,1 a 0,2% de lipídeos; 1,7 a 2,4% de carboidratos; 1,0 a 2,3% de fibra alimentar, além de minerais como cálcio, fósforo e ferro e de vitaminas C, tiamina, riboflavina e piridoxina (TACO, 2011).

Além de ser fonte de nutrientes, o alimento deve ser também inócuo à saúde dos consumidores. De acordo com MAISTRO (2001), segurança e qualidade na produção de alimento fresco são dependentes da sua microflora, dos micro-organismos presentes nele.

Micro-organismos indicadores são grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes no alimento, podem fornecer indícios sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos, além de indicarem condições sanitárias inadequadas. Micro-organismos indicadores, tais como os coliformes e os aeróbios mesófilos, vem sendo utilizados na avaliação da qualidade microbiológica da água há longo tempo, e mais recentemente na de alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2001).

A razão da escolha do grupo de coliformes como indicador de contaminação deve-se, entre outros, ao fato de que são facilmente detectáveis e quantificáveis por técnicas simples e economicamente viáveis; possuem maior tempo de vida no material contaminado que as bactérias patogênicas intestinais, por serem menos exigentes em termos nutricionais; e são mais resistentes à ação dos agentes desinfetantes do que os germes patogênicos (BRASIL, 2009).

A contagem de aeróbios mesófilos é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Um número elevado desses micro-organismos indica que o alimento pode ser insalubre porque ofereceu condições apropriadas para o desenvolvimento de micróbios

causadores de doenças alimentares, pois todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas. Portanto, uma alta contagem de mesófilos, que podem se desenvolver na mesma temperatura do corpo humano, significa que houve condições para que patógenos, caso estivessem presentes, também se multiplicassem no alimento (FRANCO & LANDGRAF, 2001).

No cultivo tradicional da alface se utiliza canteiros de terra, onde durante o seu desenvolvimento grande parte do vegetal fica em contato com o solo. O ambiente úmido associado com adubos orgânicos, muitas vezes constituídos de fezes provenientes de diversos animais, favorece as contaminações. Outro problema é que a grande maioria dos produtores irriga as hortaliças com águas provenientes de rios, córregos e lagos adjacentes às hortas, bombeadas ou levadas por meio de canais de irrigação sem nenhum tratamento prévio, o que certamente causa a contaminação (ROSA & MARTINS, 2001).

A alface é bastante exigente quanto às características químicas, físicas e biológicas do solo. Nesse sentido, a fertilização constitui-se, sem dúvida, na prática mais cara e a de maior retorno, visto que permite não só maiores rendimentos, mas também obtenção de produto com aspecto mais uniforme e, conseqüentemente, de maior valor comercial (RICCI *et al.*, 1994).

Em função do ciclo curto e de ser hortaliça cuja parte consumida e de interesse comercial são as folhas, a alface tem grande resposta ao fornecimento de nitrogênio (LOPES *et al.*, 2005). A resposta da cultura ao fornecimento de N é traduzida em maior massa média das plantas e folhas tenras e suculentas. Por sua vez, a urina de vaca aplicada em diversos vegetais causou resultados que indicam potencial de utilização, principalmente, como fertilizante (GADELHA *et al.*, 2003). Sua utilização inicial foi como nutrição em pastagem em trabalhos desenvolvidos na Nova Zelândia, nos quais foram observados efeitos positivos da urina de vaca, principalmente como fonte de K e de N.

Segundo a PESAGRO-RIO (2002), o uso da urina de vaca diminui a necessidade de agrotóxicos e adubos químicos; reduz os custos de produção; nutre corretamente a planta, aumentando o número de brotações, de folhas e flores e aumenta a produção; não causa risco à saúde do produtor e do consumidor; está pronta para uso, bastando acrescentar água; pode ser utilizada em quase todas as culturas e o efeito é rápido, além de ser facilmente obtida.

Ainda, de acordo com PESAGRO-RIO (2002), a aplicação de urina faz com que as plantas fiquem saudáveis e mais resistentes às pragas e doenças; possibilita ao produtor utilizar regularmente adubação completa, pois as principais substâncias encontradas na urina de vaca são: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, manganês, boro, cobre, zinco, sódio, cloro, cobalto, molibdênio, alumínio (abaixo de 0,1ppm), fenóis (aumentam a resistência das plantas) e ácido indolacético (hormônio natural de crescimento).

A urina de vaca, insumo agrícola, possibilita aos agricultores reduzir a dependência econômica de produtos industrializados, sobretudo na produção de hortaliças no sistema orgânico. Todavia, apesar de ser prática rotineira nas áreas de produção, esta ainda requer maior aprofundamento do conhecimento científico para a compreensão dos efeitos da sua aplicação sobre a planta, bem como a qualidade do alimento produzido (OLIVEIRA, 2007).

Resultados positivos ao crescimento de plantas de alface foram obtidos por OLIVEIRA (2007) com aplicação de urina de vaca armazenada por alguns dias após a coleta, quando uma amostra da urina foi analisada, apresentando a seguinte composição (em mg L⁻¹): N = 12.600,0; P = 97,8; K = 2.666,0; Ca = 5,0; Mg = 330,0; S = 45,0; Fe = 4,0; Mn = 4,0; Cu = 2,0; Zn = 8,0; B = 110,0; Na = 2.000,0; Co = 6,0; Mo = 9,0; Al = 2.900,0; Cl = 1.700,0 e densidade = 1,0.

Em relação à qualidade microbiológica da hortaliça cultivada com aplicações de resíduos líquidos de origem animal, há informações, por exemplo, sobre carga microbiana de alface irrigada com águas

residuárias da piscicultura e da suinocultura (BAUMGARTNER *et al.*, 2007); sobre aspectos sanitários do cultivo da alface irrigada com águas receptoras de efluentes urbanos (BISCARO *et al.*, 2008); sobre a qualidade sanitária da alface irrigada com água de reúso comparada com amostras comercializadas (VARALLO *et al.* 2011). Todavia, até o momento da realização do presente trabalho, ainda não havia informações sobre micróbios em alface cultivada com aplicação de solução com urina de vaca.

Algumas pesquisas sobre o uso de resíduos líquidos de origem animal no cultivo de alface, como de BISCARO *et al.* (2008), preocuparam-se com a questão sanitária ao indicarem a transmissão de carga contaminante do resíduo aplicado para a cultura. Outras pesquisas, como de BAUMGARTNER *et al.* (2007), sobre o uso de resíduos líquidos de origem animal no cultivo de alface, mostraram a melhoria do desenvolvimento das hortaliças e, ao mesmo tempo, a relação entre a contaminação microbiana dessas hortaliças e a carga microbiana dos resíduos utilizados. Nesses trabalhos, houve aplicação de resíduos contaminados por micróbios em volume de irrigação, o que certamente foi o fator decisivo para as altas contagens microbianas verificadas nas hortaliças.

Outras pesquisas revelaram os benefícios do cultivo de alface com a urina de vaca sem indicar possíveis transmissões de cargas microbianas contaminantes durante o cultivo (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Nesse caso, houve aplicação de doses reduzidas de urina de vaca (soluções de até 1,25%), e em frequência reduzida (cinco aplicações com intervalos de sete dias entre cada), e os resultados foram positivos para o desenvolvimento da hortaliça.

BISCARO *et al.* (2008) avaliaram aspectos sanitários do cultivo de alface americana irrigada com águas receptoras de efluentes urbanos. As análises microbiológicas foram semanais, em amostras de solo, água e cultura, desde a primeira semana após o transplante das mudas até a colheita, objetivando a verificação da quantidade de coliformes fecais. Os

autores encontraram concentrações de coliformes fecais variando de 1,1 NMP/mL a 9,3 NMP/mL no solo dos canteiros e na água de irrigação; e de 1,5 NMP/mL a 9,3 NMP/mL nas amostras da alface cultivada experimentalmente, indicando a transmissão de contaminantes dos efluentes para a cultura.

BAUMGARTNER *et al.* (2007) avaliaram o desenvolvimento, a produção e a qualidade sanitária da cultura da alface irrigada com águas residuárias originadas da suinocultura e da piscicultura. Os tratamentos avaliados foram: T1 – água de origem subterrânea e adubação suplementar; T2 – água residuária de viveiro de peixes alimentados com ração; T3 – água residuária originária de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, e T4 – água de lagoa de cultivo de algas, alimentada com resíduo de biodigestor de dejetos de suíno. A carga microbiana dos tratamentos foi de $>2,3 \times 10^0$ NMP/100mL de coliformes totais e $<1,1 \times 10^0$ NMP/100mL de coliformes fecais para o T1; $1,7 \times 10^3$ NMP/100mL de coliformes totais e $5,0 \times 10^2$ NMP/100mL de coliformes fecais para o T2; $5,0 \times 10^4$ NMP/100mL de coliformes totais e $5,0 \times 10^4$ NMP/100mL de coliformes fecais para o T3; $9,0 \times 10^4$ NMP/100mL de coliformes totais e $5,0 \times 10^4$ NMP/100mL de coliformes fecais para o T4. Em todos os tratamentos, ocorreram contaminações da alface por coliformes fecais e totais, sendo mais pronunciada em T3 e T4. Os tratamentos que apresentaram as maiores concentrações de micro-organismos produziram as hortaliças mais contaminadas.

Em estudos com resíduos líquidos de origem animal em alface, deve-se buscar respostas sobre possíveis efeitos positivos desses resíduos para o desenvolvimento das culturas e sobre a segurança alimentar da hortaliça produzida.

Outra preocupação se refere aos procedimentos para higienização dessa alface no preparo da alimentação. Lavar em água pura é apenas o início da higienização de alimentos; é uma atividade inacabada, pois, a higienização inclui etapas de limpeza e sanitização das superfícies dos alimentos. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos

orgânicos e minerais aderidos às superfícies dos alimentos e a sanitização tem como objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de micro-organismos alteradores, que causam deteriorações de alimentos, para níveis considerados seguros (ANDRADE, 2008).

A limpeza é realizada em etapas de pré-lavagem em água pura, uso de detergentes e enxágue com água pura, e a sanitização pode ser efetuada pelo uso de substâncias químicas como, por exemplo, compostos clorados (ANDRADE, 2008). Portanto, a lavagem de alface em água pura não é considerada sequer como procedimento de limpeza completo, mas apenas o seu primeiro momento e não pode ser considerada higienização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Generalidades

Foram conduzidos quatro experimentos com alface, em sistema de cultivo orgânico, submetida aos tratamentos com aplicação de diferentes soluções de urina de vaca, no período de novembro de 2011 a novembro de 2012. Os experimentos foram realizados no IFMG – *Campus* São João Evangelista (IFMG-SJE). O município de São João Evangelista localiza-se no Vale do Rio Doce, mais exatamente no Vale do Rio Suaçuí, a 18°54' de latitude sul e 42°76' de longitude oeste (IBGE, 2013) e altitude de 680 m (IFMG-SJE, 2013).

Os experimentos foram desenvolvidos em ambiente protegido e em laboratórios do IFMG-SJE. As análises de solo do local de cultivo e do esterco usado na adubação orgânica foram realizadas no Laboratório de Análise de Solos. A alface foi cultivada no Setor de Horticultura. A urina foi coletada de vacas em lactação do plantel do Setor de Bovinocultura. As análises de água de irrigação, urina de vaca, soluções de urina de vaca e amostras de alface foram realizadas no Laboratório de Microbiologia.

Os experimentos 1 e 2 foram realizados simultaneamente no período de novembro de 2011 a fevereiro de 2012. Os experimentos 3 e 4 foram simultâneos no período de agosto a novembro de 2012.

3.2. Água de irrigação

A água de irrigação utilizada nos quatro experimentos foi a mesma utilizada no cotidiano do Setor de Horticultura do IFMG-SJE. É a água bruta captada pela Estação de Tratamento de Água (ETA) do IFMG-SJE no Rio São Nicolau Pequeno. Essa água, em um determinado ponto dos tubos de captação, divide-se em dois trajetos distintos: uma parte segue para a ETA/IFMG-SJE, para ser tratada e abastecer a comunidade acadêmica; a outra segue para a irrigação das hortaliças cultivadas no *campus*.

A irrigação de alface dos experimentos foi realizada pelo sistema de microaspersão, e as coletas das amostras de água foram realizadas diretamente nos bicos dos aspersores localizados nos ambientes dos cultivos.

As amostras da água de irrigação foram coletadas semanalmente e conduzidas ao Laboratório de Microbiologia do IFMG-SJE para contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e micro-organismos aeróbios mesófilos. Em todos os experimentos, a primeira coleta de amostras de água foi realizada no início do preparo das mudas de alface e a última ocorreu sempre na etapa final de cultivo, exatamente na semana da colheita das plantas.

As amostras de água de irrigação foram coletadas em frascos de borossilicato com bocas largas, capacidade de 600 mL, previamente esterilizados. Todos os procedimentos, desde o campo até o laboratório, seguiram as recomendações de BRASIL (2009).

As contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes das amostras de água de irrigação seguiram a metodologia da Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2009). As contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por SILVA *et al.* (2010).

3.3. Urina de vaca: coleta e análise

A urina foi coletada de vacas em lactação, do plantel de sanidade comprovada, do rebanho leiteiro do Setor de Bovinocultura do IFMG-SJE.

Nos experimentos 1 e 2, a coleta da urina ocorreu no dia 19/11/2011, 11 dias antes da primeira aplicação. Nos experimentos 3 e 4, a urina foi coletada no dia 27/07/2012, 49 dias antes da primeira aplicação.

A urina foi coletada e armazenada em recipiente de polietileno, de cor branca leitosa, fechado com tampa de rosca, popularmente chamado de bombona plástica. Para cada uma das duas coletas realizadas, utilizou-se bombona nova, adquirida exclusivamente para esse fim. Antes de seu uso nos experimentos, cada bombona foi submetida a um procedimento de limpeza para minimizar, ou mesmo eliminar, alguma possibilidade de contaminação da urina, ocasionada pela própria bombona, durante o momento da coleta e o período de armazenamento.

A limpeza de cada bombona, na véspera da coleta da urina de vaca, foi realizada com água tratada, pura, fornecida pela ETA/IFMG-SJE. A atividade de limpeza consistiu em operação muito simples, repetida diversas vezes em um único período de tempo, com duração de alguns minutos: adição de água da ETA/IFMG-SJE até cerca de 1/3 da bombona, fechamento do recipiente com a sua tampa de rosca, vigorosa agitação por alguns segundos e, a seguir, o seu esvaziamento completo. Finalizado o procedimento de limpeza, a bombona foi totalmente preenchida com água tratada da ETA/IFMG-SJE e mantida cheia e fechada com sua tampa de rosca até o momento imediatamente anterior à coleta.

No instante da coleta da urina de vaca, a bombona foi completamente esvaziada e, nesse momento, uma amostra dessa água foi coletada e conduzida ao Laboratório de Microbiologia do IFMG-SJE e feita a contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes, segundo a metodologia da Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2009)

e contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos de acordo com as metodologias apresentadas por SILVA *et al.* (2010), visando, assim, a verificação da eficácia do procedimento de limpeza da bombona.

Cada bombona limpa e vazia foi, então, utilizada na coleta, momentos antes do início da ordenha da manhã. A coleta da urina ocorreu em um piquete a poucos metros do estabelecimento da ordenha mecanizada, enquanto as vacas, que ali haviam passado a noite, levantavam-se e eram conduzidas pelo ordenhador até o estábulo.

As vacas, quando se levantavam, invariavelmente, defecavam e urinavam em abundância. No momento em que ficavam de pé, enquanto urinavam, a bombona era aberta e posicionada de modo a recolher a urina que jorrava. Nas duas datas de coleta, o procedimento durou alguns minutos até que cada bombona, com capacidade para 10 L, estivesse cheia de urina coletada de algumas vacas.

A bombona cheia de urina foi fechada com sua tampa de rosca, acondicionada dentro de um saco plástico preto e levada ao Laboratório de Microbiologia onde foi armazenada em local fresco ao abrigo da luz e utilizada nas aplicações e análises.

O plano de trabalho em relação às análises microbiológicas da urina de vaca, inicialmente limitava-se à contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos com a finalidade de verificação da presença de micróbios na urina de vaca para, então, reconhecê-la como fonte de contaminação microbiana para as hortaliças. Contudo, no instante da coleta da urina, diante da explícita fecalização das vulvas pelas próprias vacas, a realização das contagens dos coliformes tornou-se algo absolutamente necessário.

A partir da coleta, portanto, a urina de vaca, pura, dos quatro experimentos foi semanalmente analisada no Laboratório de Microbiologia do IFMG-SJE. As contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes das amostras de urina seguiram a metodologia da Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2009). As contagens de aeróbios

mesófilos foram realizadas de acordo com as metodologias apresentadas por SILVA *et al.* (2010).

Nos experimentos 1 e 2, as análises microbiológicas da urina foram realizadas em dez ocasiões diferentes, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Datas de realização das análises microbiológicas da urina de vaca, pura, empregada no preparo das soluções para pulverizações dos experimentos 1 e 2.

Amostra	Data	Ocasião
1	19/11/2011	Dia da coleta da urina de vaca
2	23/11/2011	Uma semana antes da 1ª aplicação em alface
3	30/11/2011	No dia da 1ª aplicação
4	07/12/2011	No dia da 2ª aplicação
5	14/12/2011	No dia da 3ª aplicação
6	21/12/2011	No dia da 4ª aplicação
7	28/12/2011	No dia da 5ª aplicação
8	04/01/2012	Uma semana após o fim das aplicações
9	11/01/2012	Duas semanas após o fim das aplicações
10	18/01/2012	Três semanas após o fim das aplicações

As três últimas análises microbiológicas da urina de vaca, realizadas após a última pulverização dos experimentos, visaram a verificação do momento em que as taxas microbianas da urina armazenada estivessem reduzidas ou mesmo zeradas, pois, durante as semanas de aplicações, observou-se tendência de queda da taxa microbiana dessa urina e, assim, fez-se necessário verificar que valor essa queda atingiria.

Nos experimentos 3 e 4, as análises microbiológicas da urina pura foram realizadas em doze momentos. Sete análises anteriores ao início dos preparos e aplicações das soluções de urina, e cinco análises durante as semanas das aplicações, conforme Tabela 2.

Com base nos experimentos 1 e 2, em que houve queda da taxa microbiana com o tempo de armazenamento, a coleta da urina de vaca para os experimentos 3 e 4 foi realizada sete semanas antes da primeira aplicação para utilizar-se uma urina com menor taxa microbiana.

Esse foi, de fato, um ponto a se ressaltar, pois, com base em resultados de análises microbiológicas dos experimentos 1 e 2, houve a definição do momento ideal para a coleta, preparo e aplicação das soluções nos experimentos 3 e 4, de modo a se dispor da urina de vaca que não levasse micróbios até a alface.

Tabela 2. Datas de realização das análises microbiológicas da urina de vaca, pura, empregada no preparo das soluções para pulverizações dos experimentos 3 e 4.

Amostra	Data	Ocasão
1	27/07/2012	Dia da coleta da urina de vaca
2	03/08/2012	Seis semanas antes da 1ª aplicação
3	10/08/2012	Cinco semanas antes da 1ª aplicação
4	17/08/2012	Quatro semanas antes da 1ª aplicação
5	24/08/2012	Três semanas antes da 1ª aplicação
6	31/08/2012	Duas semanas antes da 1ª aplicação
7	07/09/2012	Uma semana antes da 1ª aplicação
8	14/09/2012	No dia da 1ª aplicação
9	21/09/2012	No dia da 2ª aplicação
10	28/09/2012	No dia da 3ª aplicação
11	05/10/2012	No dia da 4ª aplicação
12	12/10/2012	No dia da 5ª aplicação

3.4. Preparo e aplicação das soluções de urina de vaca nos experimentos

A urina de vaca armazenada, analisada semanalmente, foi utilizada no preparo das soluções, com diferentes concentrações, para aplicações em alface dos quatro experimentos.

As soluções foram preparadas por meio da diluição de quantidades determinadas da urina de vaca, armazenada na bombona, em água de irrigação das hortaliças (item 3.2) a fim de se obter a concentração determinada.

Nos experimentos 1 e 2 foram preparadas e aplicadas soluções de urina de vaca nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0%. Nos experimentos 3 e 4 foram preparadas e aplicadas soluções nas concentrações de 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0%. Nos quatro experimentos a

solução na concentração de 0% (testemunha) correspondeu à aplicação de apenas água de irrigação.

Foi aplicado o volume total de 60 mL/planta de cada solução de urina de vaca, segundo metodologia de OLIVEIRA (2007). Essa dose de 60 mL/planta foi dividida em cinco aplicações, uma por semana, iniciando uma semana após o transplante das mudas. Nessas aplicações foram pulverizados, respectivamente, 5, 5, 10, 20 e 20 mL de solução/planta.

Nas aplicações das soluções foi empregado um pulverizador lateral de alta pressão, capacidade útil de 5 L, com pressão máxima de trabalho de até 200 lbf/pol².

Cada solução foi preparada no momento da aplicação, diretamente no recipiente do pulverizador. As doses de urina de vaca foram pipetadas e as quantidades de água foram medidas com o auxílio de proveta. As vidrarias esterilizadas foram levadas do laboratório para o campo com a finalidade de permitir as medições precisas. As aplicações sempre foram realizadas ordenadamente a partir da solução de menor para a solução de maior concentração de urina de vaca.

Quando a aplicação foi via foliar, utilizou-se o pulverizador cuidadosamente, evitando-se o escorrimento das soluções das folhas para o solo. Além disso, no momento da aplicação via foliar foram utilizadas folhas de papelão para isolar as plantas que receberam soluções de diferentes concentrações, protegendo-as e evitando deriva das soluções. Na aplicação via solo, a solução foi vertida ao redor das plantas, sem entrar em contato com a sua parte aérea.

Nos dias das aplicações de soluções de urina de vaca, foram coletadas amostras das soluções preparadas para realização de análises microbiológicas no Laboratório de Microbiologia do IFMG-SJE. As contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes das amostras das soluções com diferentes concentrações de urina de vaca seguiram a metodologia da Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2009). As contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos foram realizadas de acordo com as metodologias apresentadas por SILVA *et al.* (2010).

3.5. Cultivo da alface

O cultivo de alface dos quatro experimentos foi realizado em ambiente protegido no Setor de Horticultura do IFMG-SJE.

As mudas foram produzidas em bandejas de poliestireno expandido de 200 células mantidas em ambiente protegido. As bandejas foram preenchidas com substrato preparado com uma mistura de terra dos canteiros de cultivo e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1 (v:v). O substrato, antes de sua utilização, foi submetido a sete dias de solarização debaixo de lona plástica transparente conforme OLIVEIRA (2007).

Na sementeira utilizou-se duas sementes/célula e, no 12º dia após a sementeira, realizou-se o desbaste deixando-se apenas uma plântula/célula. O transplante das mudas para os canteiros de cultivo ocorreu 25 dias depois da sementeira quando elas apresentavam cerca de quatro folhas definitivas.

O ambiente protegido (casa de vegetação) tinha 20,0 x 12,0 m, pé-direito de 2,5 m e altura do vão central de 3,0 m, sendo coberta com filme agrícola de 150 micra e protegido nas laterais com sombrite 50%.

O solo da área de cultivo tem a composição indicada pela análise química apresentada na Tabela 3.

Cinco dias antes do transplante das mudas, procedeu-se à adubação de plantio, utilizando-se apenas esterco bovino curtido na quantidade equivalente a 31,6 t ha⁻¹, em massa seca, cuja análise química é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados das análises de amostras do solo da área de cultivo antes da adubação orgânica e do esterco bovino curtido utilizado na adubação de plantio da alface. Laboratório de Análise de Solos, Registro nº 41, IFMG-SJE.

Característica	Unidade	Solo	Esterco
pH	H ₂ O	6,74	8,43
P	mg/dm ³	298,7	650,8
K	mg/dm ³	220	2240
Ca ²⁺	cmol _c /dm ³	5,50	6,70
Mg ²⁺	cmol _c /dm ³	1,00	4,40
Al ³⁺	cmol _c /dm ³	0,00	0,00
H + Al	cmol _c /dm ³	1,30	0,51
SB	cmol _c /dm ³	7,06	16,83
(t)	cmol _c /dm ³	7,06	16,83
(T)	cmol _c /dm ³	8,36	17,34
V	%	84,4	97,1
m	%	0,00	0,00
MO	dag/Kg	2,26	9,15
P-rem	mg/L	39,4	34,3

pH em água, KCl e CaCl₂ – Relação 1:2,5; P – Na – K – Fe – Zn – Mn – Cu – Extrator Mehlich 1; Ca – Mg – Al – Extrator: KCl 1N; H + Al – Extrator: SMP; B – Extrator água quente; S – Extrator – Fosfato monocálcico em ácido acético; SB= Soma de Bases Trocáveis; CTC (t) – Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; CTC (T) – Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V= Índice de Saturação de Bases; m= Índice de Saturação de Alumínio; ISNa= Índice de Saturação de Sódio; Mat. Org. (MO) – Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10N; P-rem= Fósforo Remanescente.

Nos experimentos 1 e 2 foi utilizada a cultivar Regina 2000; no experimento 3 foi utilizada a cultivar Regina 500 e no experimento 4 utilizou-se a cultivar Babá de Verão.

Os experimentos 1 e 2 foram constituídos de cinco tratamentos, correspondentes às concentrações das soluções com urina de vaca 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0%. No experimento 1, a aplicação das soluções de urina foi via foliar e no experimento 2 foi via solo. Ambos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Os experimentos 3 e 4 foram constituídos de cinco tratamentos, correspondentes às soluções nas concentrações 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0%. Em ambos experimentos, a aplicação das soluções foi via foliar sendo que no experimento 3 foi utilizada alface Regina 500 (aberta ou folhas soltas), e no experimento 4 a alface Babá de Verão (fechada ou de

cabeça). Ambos experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Foram preparados, e utilizados para os cultivos, canteiros com dimensões de 17,5 x 1,0 x 0,30 m (comprimento x largura x altura).

A unidade experimental para os quatro experimentos foi constituída por quatro fileiras longitudinais de 1,75 m de comprimento, com plantas no espaçamento de 0,25 x 0,25 m, totalizando 28 plantas. Foram consideradas como úteis, as seis plantas centrais das duas fileiras centrais, conforme esquema abaixo (Figura 1).





























						
						
						
						

Figura 1. Esquema da unidade experimental constituída por 28 plantas. As seis plantas centrais das duas fileiras centrais corresponderam à área útil para a coleta de amostras.

A irrigação foi realizada diariamente por aspersão. Entretanto, nos dias das pulverizações, após a aplicação das soluções de urina de vaca, as alfaces ficaram o intervalo de cerca de 42 horas sem irrigação. Esse período sem irrigação incluía o resto do dia pós-pulverização, todo o dia seguinte e até o meio-dia do segundo dia após a aplicação. Semanalmente, foi realizada a retirada manual das plantas espontâneas.

A colheita foi realizada aos 46 dias após o transplante das mudas, quando as plantas estavam no ponto de colheita comercial. As amostras de alface foram submetidas a avaliações de algumas características e a análises microbiológicas.

3.6. Características avaliadas nas plantas

Em três plantas colhidas aleatoriamente na área útil de cada unidade experimental, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas por planta (NFP); massa de matéria fresca de folhas (MFF); comprimento de caule (CC); massa de matéria fresca de caule (MFC) e massa de matéria fresca de cabeça (MFCA).

O NFP foi obtido por meio da contagem de todas as folhas presentes na cabeça com tamanho mínimo de 5 cm de comprimento. A MFF foi obtida por pesagem das folhas da cabeça sem o caule, após a colheita. O CC foi o correspondente à medida da porção de caule presente na cabeça comercial, expressa em cm. A MFC foi obtida por meio da pesagem do caule presente na cabeça, sem as folhas, imediatamente após a colheita. A MFCA foi obtida pela soma dos valores de MFF mais MFC, expressa em g/planta.

3.7. Análises microbiológicas de alface não lavada

Para a realização das análises microbiológicas, foram colhidas aleatoriamente três plantas na área útil de cada unidade experimental e conduzidas devidamente acondicionadas ao Laboratório de Microbiologia do IFMG-SJE, onde foram processadas as amostras.

Foram realizadas contagens de coliformes totais, coliformes termotolerantes e micro-organismos aeróbios mesófilos de acordo com as metodologias indicadas por SILVA *et al.* (2010).

3.7.1. Análises microbiológicas de alface lavada apenas em água pura tratada

Amostras de alface dos quatro experimentos foram lavadas em água pura da ETA/IFMG-SJE e, a seguir, submetidas às análises para contagens de coliformes totais, coliformes termotolerantes e microorganismos aeróbios mesófilos, segundo as metodologias indicadas por SILVA *et al.* (2010).

As análises de alface dos quatro experimentos lavadas apenas em água pura visaram indicar se tal prática é, ou não é, suficiente para a eliminação dos riscos microbiológicos na hortaliça.

A decisão de se incluir a análise de alface lavada apenas em água pura fundamentou-se na pressuposição de que nos domicílios e em certos estabelecimentos que comercializam refeições prontas as hortaliças não são adequadamente higienizadas.

Para a verificação da pertinência do pressuposto de que a alface não recebe um tratamento higiênico adequado, foi realizada uma pesquisa em São João Evangelista, Minas Gerais, em outubro de 2011, sobre como a população higieniza a hortaliça em seus domicílios e nos estabelecimentos de comercialização de refeições prontas, tais como lanchonetes e restaurantes. Cada entrevistado respondeu livremente a uma única pergunta que lhe foi feita: “— Como você higieniza a alface antes de prepará-la para o consumo?”

De acordo com o Censo Demográfico 2010, a população urbana de São João Evangelista, Minas Gerais, era formada por 10.108 moradores (IBGE, 2013). A pesquisa abrangeu 288 entrevistados nos 12 bairros de toda a zona urbana de São João Evangelista, MG. Em cada bairro foram realizadas 24 entrevistas. Desse modo, a pesquisa visou identificar a atitude higiênica, em relação à alface, de uma amostra de 2,85% da população equidistantemente distribuída por toda a extensão da cidade.

3.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Para o fator qualitativo (vias de aplicação das soluções de urina de vaca), os dados dos experimentos 1 e 2 foram submetidos à análise conjunta e teste F a 5% de probabilidade. Os dados microbiológicos de alface não lavada e de alface lavada em água tratada pura, dos 4 experimentos, também foram submetidos à análise conjunta e teste F a 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo (concentração das soluções de urina de vaca), procedeu-se à análise de regressão, utilizando-se o teste t, adotando-se os níveis de 1% e 5% de probabilidade, no coeficiente de determinação R^2 e no fenômeno biológico em estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade da água de irrigação

As análises laboratoriais revelaram a presença de população microbiana na água de irrigação da alface nos experimentos 1 e 2 (Tabela 4) e 3 e 4 (Tabela 5).

Tabela 4. Resultados das análises microbiológicas da água de irrigação utilizada nos experimentos 1 e 2.

Amostra/ Data	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)	Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)
1 ^a (02/11/2011)	$1,6 \times 10^3$	$9,4 \times 10^1$	$7,9 \times 10^4$
2 ^a (09/11/2011)	$1,6 \times 10^3$	$7,9 \times 10^1$	$3,6 \times 10^4$
3 ^a (16/11/2011)	$4,3 \times 10^2$	$3,3 \times 10^1$	$2,48 \times 10^4$
4 ^a (23/11/2011)	$2,2 \times 10^2$	$2,1 \times 10^1$	$4,3 \times 10^3$
5 ^a (30/11/2011)	$1,3 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	$1,99 \times 10^4$
6 ^a (07/12/2011)	$1,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^1$	$9,5 \times 10^4$
7 ^a (14/12/2011)	$1,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^1$	$6,4 \times 10^4$
8 ^a (21/12/2011)	$>1,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	$5,1 \times 10^4$
9 ^a (28/12/2011)	$>1,6 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	$6,3 \times 10^4$

SOUTO (2005) avaliou as condições sanitárias da água de irrigação e das alfaces produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba. A autora registrou a presença de coliformes, em água de irrigação utilizada na hortaliça, nas contagens de coliformes totais que variaram de $3,30 \times 10^4$ a $2,40 \times 10^6$ UFC/100mL; contagens de coliformes fecais de $7,75 \times 10^3$ a $1,53 \times 10^6$ UFC/100mL, e contagens de mesófilos totais de

1,76 x 10⁷ a 9,48 x 10⁸ UFC/100mL. Todos esses valores indicados foram superiores aos encontrados no presente trabalho (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5. Resultados das análises microbiológicas da água de irrigação utilizada nos experimentos 3 e 4.

Amostra/ Data	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)	Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)
1 ^a (17/08/2012)	9,2 x 10 ²	1,7 x 10 ¹	5,3 x 10 ⁴
2 ^a (24/08/2012)	>1,6 x 10 ³	3,1 x 10 ¹	7,1 x 10 ⁴
3 ^a (31/08/2012)	>1,6 x 10 ³	2,2 x 10 ¹	3,9 x 10 ⁴
4 ^a (07/09/2012)	>1,6 x 10 ³	3,9 x 10 ¹	1,82 x 10 ⁴
5 ^a (14/09/2012)	5,4 x 10 ²	1,5 x 10 ¹	9,0 x 10 ⁴
6 ^a (21/09/2012)	>1,6 x 10 ³	7,0 x 10 ¹	7,8 x 10 ⁴
7 ^a (28/09/2012)	>1,6 x 10 ³	1,3 x 10 ²	1,24 x 10 ⁴
8 ^a (05/10/2012)	>1,6 x 10 ³	9,4 x 10 ¹	2,17 x 10 ³
9 ^a (12/10/2012)	1,6 x 10 ³	4,9 x 10 ¹	8,8 x 10 ⁴

De acordo com SOUTO (2005), os valores médios de coliformes totais e fecais em águas de irrigação nas propriedades estudadas, evidenciaram que as condições do manejo do sistema agrícola adotados pelos produtores não são adequados ao uso em culturas cujo produto é consumido *in natura*. A autora considerou os valores das contagens microbianas da água de irrigação elevados e preocupantes, pois, a contaminação foi transmitida da água para a alface.

Em avaliação microbiológica de água de irrigação de alface, ARBOS *et al.* (2010), verificaram contagens de <3 a 2,4 x 10³ NMP/g coliforme total; <3 a 2,4 x 10³ NMP/g coliforme fecal; 3 x 10² a 4,1 x 10⁴ UFC/g de mesófilos aeróbios. Segundo esses autores, a alface é a hortaliça folhosa de maior preferência entre os consumidores no Brasil devido ao seu baixo valor calórico, o que a qualifica a diversas dietas, basicamente no que se refere à elevação no consumo de hortaliças *in natura*. Contudo, o consumo de hortaliças cruas contribui como importante meio de transmissão de várias enfermidades intestinais.

Os resultados obtidos por ARBOS *et al.* (2010) na avaliação microbiológica de alface indicaram que 94% das amostras apresentaram

índices inaceitáveis de contaminação por coliformes totais, 88% por coliformes termotolerantes e que os valores encontrados para bactérias aeróbias mesófilas variaram de $1,4 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^5$ UFC/mL. Os altos índices de contaminação fecal encontrados em alface indicaram que as amostras de água utilizadas na irrigação estavam em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, com a possibilidade de serem veiculadoras de contaminação por micro-organismos patogênicos. Essa argumentação deve ser destacada, pois os autores apontaram a contaminação da hortaliça como decorrência direta da contaminação da água de irrigação.

A qualidade sanitária da alface irrigada com água de reúso foi comparada com amostras comercializadas em trabalho de VARALLO *et al.* (2011). A água de reúso analisada pelos autores, proveniente de cozinha e banheiros do local do experimento de campo, era captada de um sistema fossa-filtro composto de um tanque séptico seguido de um filtro anaeróbio. Conforme os autores, a água foi submetida a algum procedimento de redução de carga microbiana contaminante, mas, nem por isso, ficou livre de micróbios. No caso das alfaces comercializadas pelo produtor rural a água de irrigação analisada pelos autores era retirada de afloramento do lençol freático. Os valores médios verificados na água de irrigação do produtor rural foram $2,1 \times 10^1$ NMP/100mL em ambos os grupos de coliformes; e, na água de reúso, foi $9,0 \times 10^4$ NMP/100mL de coliformes totais e $5,0 \times 10^2$ NMP/100mL de coliformes a 45°C.

Previsivelmente, nas alfaces dos experimentos de VARALLO *et al.* (2011) irrigadas com as águas de reúso e naquelas irrigadas com a água do produtor rural, as taxas microbianas foram consideráveis. As contagens de coliformes totais passaram de $1,1 \times 10^3$ NMP/g e as contagens de coliformes a 45°C alcançaram $4,3 \times 10^1$ NMP/g.

Desse modo, os autores reforçaram a ideia de que água de irrigação contaminada por micróbios resulta em alface contaminada. Contudo, um ponto a ser mais destacado no trabalho de VARALLO *et al.* (2011), foi a inclusão, como testemunha, no cultivo experimental, de

alfaces irrigadas com água de abastecimento local, em que não ocorreram contaminações importantes por coliformes totais e termotolerantes. Nesse caso, os autores concluíram que alface irrigada com água livre de micróbios ficou livre de contaminação importante, pois a contaminação da alface é diretamente determinada pela qualidade microbiológica da água de irrigação.

A água de irrigação é a grande fonte de contaminação da alface. Os resultados das contagens microbianas apresentados nas Tabelas 4 e 5 confirmaram esse fato ao revelarem presença microbiana considerável e constante, durante semanas seguidas, na água de irrigação. A presença de coliformes totais sempre esteve na ordem de 10^2 a 10^4 por 100 mL; os termotolerantes, entre 10^1 e 10^3 por 100 mL; e os micro-organismos aeróbios mesófilos, entre 10^3 e 10^5 por 1mL.

A alface dos quatro experimentos foi exposta diariamente, durante algumas semanas, aos micróbios transmitidos pela água de irrigação. Quando considerados em conjunto, três fatores podem potencializar a capacidade contaminante da água de irrigação: a carga microbiana, o volume aplicado diariamente e os dias seguidos dessa aplicação. Dificilmente haverá outro meio de contaminação microbiológica da alface que supere ou sequer se iguale ao da água de irrigação.

Por tudo isso, não se deve subestimar a decisiva contribuição da água de irrigação para a definição da microbiota da superfície de alface e também por sua contaminação microbiológica.

4.2. Contaminantes nos recipientes

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de água tratada usada no preenchimento das bombonas, desde o procedimento de limpeza na véspera até o instante imediatamente anterior à coleta da urina de vaca, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados das análises microbiológicas da água tratada da ETA/IFMG-SJE usada no preenchimento da bombona limpa.

Amostra/ Data	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)	Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)
1ª (19/11/2011)	<2	<2	0
2ª (27/07/2012)	<2	<2	0

Os resultados indicaram que as bombonas novas, após os procedimentos de limpeza, tornaram-se livres de cargas microbianas contaminantes. A indicação de <2 NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por 100mL de água pode ser considerada a expressão da ausência desses micróbios nas amostras analisadas, pois, de acordo com BRASIL (2009), esse resultado é possível quando não há crescimento desses micróbios nos meios empregados para a sua verificação e contagem. Os resultados da Tabela 6 permitem, portanto, o entendimento de que se algum micróbio for verificado na urina de vaca armazenada poderá ter qualquer origem exceto a própria bombona.

4.3. Contaminantes na urina de vaca

Os resultados das análises da urina de vaca pura, usada para o preparo das soluções aplicadas nos quatro experimentos, que foi permanentemente mantida em recipiente hermeticamente fechado e protegida da luz, encontram-se nas Figuras 2, 3, 4 e 5.

A coleta da urina de vaca utilizada no preparo das soluções aplicadas nos experimentos 1 e 2 ocorreu 11 dias antes da primeira aplicação. Pode-se verificar que, no dia da coleta (19/11/2011), a urina de vaca pura apresentou determinada taxa microbiana que aumentou com o transcorrer do período de armazenamento, atingindo estabilidade e, a partir da 5ª semana, a taxa de contaminantes caiu abruptamente até valores zero ou próximos de zero (Figuras 2 e 3).

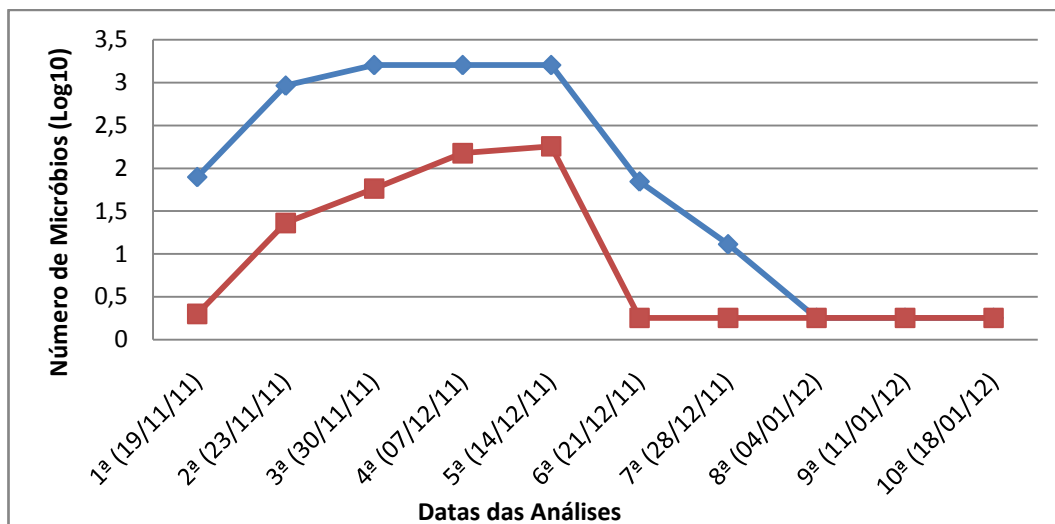


Figura 2. Coliformes totais (♦) e coliformes termotolerantes (■) presentes na urina de vaca pura (NMP/100 mL) utilizada no preparo das soluções aplicadas nos experimentos 1 e 2.

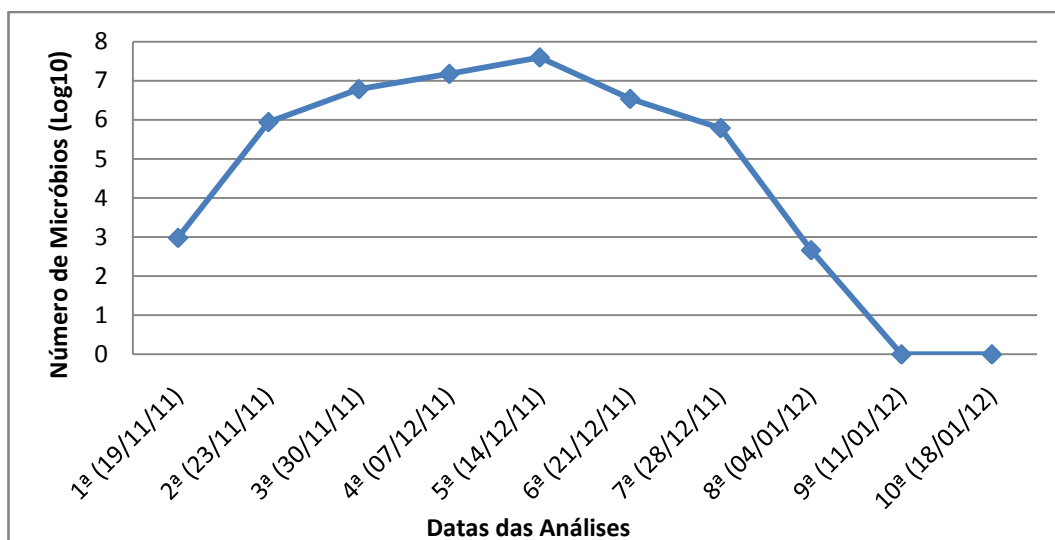


Figura 3. Micro-organismos aeróbios mesófilos (♦) presentes na urina de vaca pura (UFC/mL) utilizada no preparo de soluções aplicadas nos experimentos 1 e 2.

A primeira análise microbiológica da urina de vaca pura, no dia da coleta, indicou baixa presença microbiana, ou seja: $7,9 \times 10^1$ coliformes totais/100mL e $2,0 \times 10^0$ coliformes termotolerantes/100 mL (Figura 2); e $9,5 \times 10^2$ micro-organismos aeróbios mesófilos/mL (Figura 3). A partir da 1ª análise, foi constatado o aumento progressivo da carga microbiana da

urina hermeticamente armazenada na bombona plástica, alcançando, na 5ª análise, valores de $>1,6 \times 10^3$ NMP/100mL de coliformes totais; $1,8 \times 10^2$ NMP/100mL coliformes termotolerantes; e $3,9 \times 10^7$ UFC/mL micro-organismos aeróbios mesófilos. A partir da 5ª semana, houve queda brusca, alcançando, na 9ª semana de armazenamento, valores de $<2,0 \times 10^0$ NMP/100mL de coliformes totais; $<2,0 \times 10^0$ NMP/100mL de coliformes termotolerantes; e $0,0 \times 10^0$ UFC/mL de micro-organismos aeróbios mesófilos. Esses valores permaneceram na 10ª semana e são considerados ausência de micróbios, de acordo com BRASIL (2009).

Segundo NELSON & COX (2011), a maior parte dos animais terrestres é ureotélica e excreta o nitrogênio amínico na forma de ureia. A produção de ureia ocorre quase que exclusivamente no fígado, sendo o destino da maior parte da amônia canalizada para esse órgão. A ureia passa para a circulação sanguínea e chega aos rins, sendo excretada na urina.

Além da ureia, é eliminado diariamente na urina, água, sódio, cálcio, fósforo, ácido úrico e inúmeros outros produtos do catabolismo do organismo. O trabalho metabólico aproveita o que serve para o organismo e rejeita o que não deve ser assimilado (produto catabólico) e envia ao rim para ser eliminado por ser desnecessário (RIELLA, 2003).

Os micróbios presentes na urina de vaca pura, armazenada nas bombonas, utilizaram as moléculas e íons presentes na urina para obterem energia e precursores moleculares para o seu crescimento e reprodução. Desse modo, a população inicial de micróbios encontrou alimentos na urina de vaca armazenada e passou por um período de expansão até que os nutrientes da urina se tornassem escassos e houvesse estabilização da população microbiana. A seguir, após o consumo dos nutrientes, os micróbios entraram em um processo coletivo de fome e morte que resultou em urina livre de contaminantes.

Nos experimentos 1 e 2, sem o conhecimento do padrão de desenvolvimento dos micróbios na urina armazenada, o preparo das soluções e a aplicação foi realizada a partir dos 11 dias de

armazenamento da urina. Portanto, nos momentos em que a urina apresentava taxas elevadas de contaminantes, ou seja, do dia 30/11/2011 até o dia 28/12/2011 (Figuras 2 e 3). Essa decisão foi baseada no trabalho de OLIVEIRA (2007) que empregou, em seus tratamentos, a urina de vaca armazenada a partir do décimo dia de coleta.

A observação do padrão de crescimento dos micro-organismos avaliados na urina armazenada em bombona, e utilizada nos experimentos 1 e 2, foi de fundamental importância para definição da data de coleta e período de armazenamento antes da aplicação das soluções de urina de vaca nos experimentos 3 e 4.

Portanto, a partir de observações dos experimentos 1 e 2, com o conhecimento de que a partir da 7ª semana de coleta e armazenamento em bombona fechada a urina apresentava taxas microbianas tendendo ao zero, realizou-se a coleta da urina destinada aos experimentos 3 e 4 aos 49 dias antes da primeira aplicação das soluções de urina em alface, com o objetivo de se aplicar soluções com baixa carga microbiana ou mesmo livre de contaminação.

Na análise da urina armazenada em bombona destinada à aplicação nos experimentos 3 e 4 (Figuras 4 e 5), observou-se o mesmo padrão de desenvolvimento dos micro-organismos observado na urina de vaca armazenada na bombona plástica utilizada nos experimentos 1 e 2.

Logo, o objetivo de se utilizar urina com baixa carga microbiana nos experimentos 3 e 4 foi alcançado, pois nos momentos do preparo e aplicação das soluções de urina de vaca em alface, do dia 14/09/2012 ao dia 12/10/2012, as contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes da urina armazenada já estavam estabilizadas em $<2,0 \times 10^0$ NMP/100mL, conforme indicação da 8ª análise em diante, e a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos que foi de $3,0 \times 10^0$ UFC/mL na 8ª análise, estabilizou-se em $0,0 \times 10^0$ UFC/mL a partir da 9ª análise (Figuras 4 e 5).

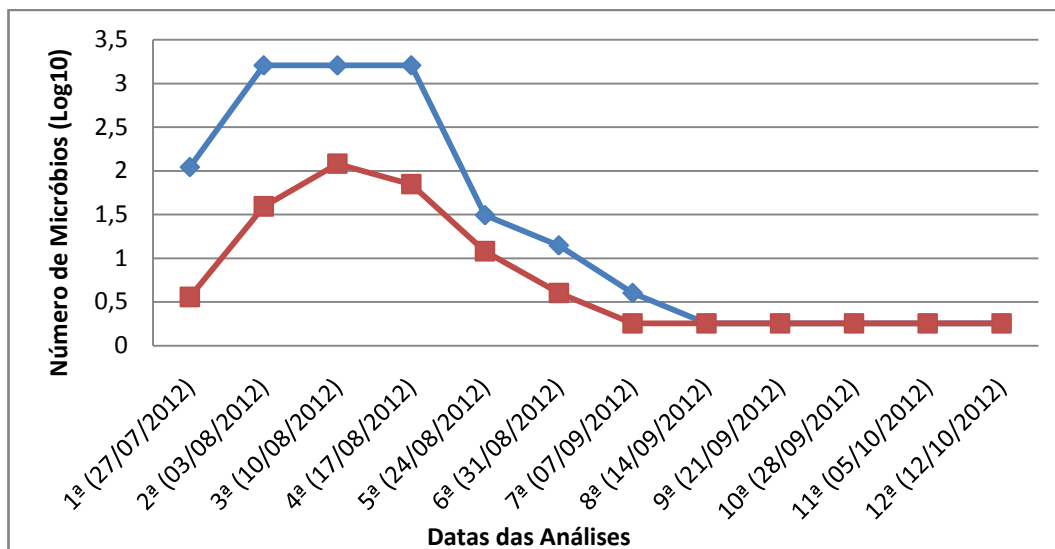


Figura 4. Coliformes totais (♦) e coliformes termotolerantes (■) presentes na urina de vaca pura (NMP/100 mL) utilizada no preparo das soluções aplicadas nos experimentos 3 e 4.

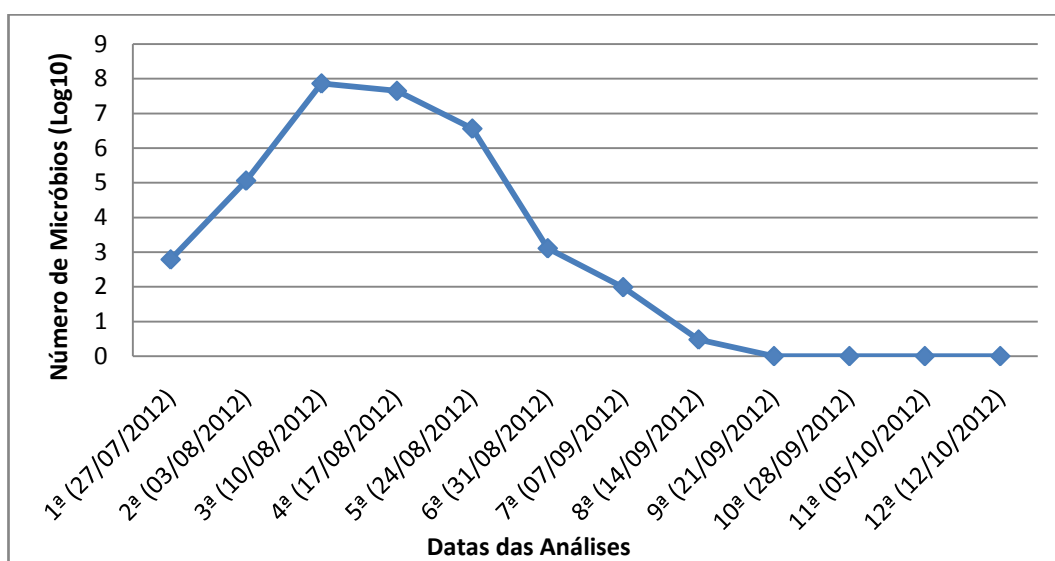


Figura 5. Micro-organismos aeróbios mesófilos (♦) presentes na urina de vaca pura (UFC/mL) utilizada no preparo de soluções aplicadas nos experimentos 3 e 4.

Finalmente, no presente trabalho, as análises revelaram que a urina com maior período de armazenamento pós-coleta apresentou menores taxas microbiológicas do que a urina mais nova (Figuras 2 a 5).

Essa informação indica a possibilidade de preparo e aplicação, em alface, de soluções de urina de vaca livre de micróbios.

4.4. Contaminantes nas soluções de urina de vaca

4.4.1. Contaminantes nas soluções de urina de vaca utilizadas nos experimentos 1 e 2

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas soluções aplicadas na alface, nos experimentos 1 e 2, nas respectivas datas de aplicação, revelaram a presença microbiana em todas as concentrações preparadas (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados das análises microbiológicas para Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e Aeróbios Mesófilos em soluções de urina de vaca nas concentrações de 0,0 (testemunha), 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0%, nas respectivas datas de aplicação nas plantas de alface dos experimentos 1 e 2.

Avaliação/ Data	Concentração de urina v/v (%)				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
Coliformes Totais (NMP/100 mL)					
1 ^a (30/11/2011)	$1,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$
2 ^a (07/12/2011)	$1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$
3 ^a (14/12/2011)	$1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$
4 ^a (21/12/2011)	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$
5 ^a (28/12/2011)	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$>1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
Coliformes Termotolerantes (NMP/100 mL)					
1 ^a (30/11/2011)	$2,2 \times 10^1$	$2,5 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$	$2,2 \times 10^1$	$2,4 \times 10^1$
2 ^a (07/12/2011)	$1,1 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	$1,3 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
3 ^a (14/12/2011)	$1,4 \times 10^1$	$2,2 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$
4 ^a (21/12/2011)	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$9,4 \times 10^1$	$9,4 \times 10^1$
5 ^a (28/12/2011)	$1,7 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)					
1 ^a (30/11/2011)	$1,99 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$	$7,9 \times 10^4$	$1,39 \times 10^5$	$2,59 \times 10^5$
2 ^a (07/12/2011)	$9,5 \times 10^4$	$8,3 \times 10^5$	$2,42 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$
3 ^a (14/12/2011)	$6,4 \times 10^4$	$2,01 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$8,4 \times 10^5$	$1,62 \times 10^6$
4 ^a (21/12/2011)	$5,1 \times 10^4$	$2,21 \times 10^5$	$8,4 \times 10^4$	$1,17 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5$
5 ^a (28/12/2011)	$6,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$

A solução de concentração 0% de urina de vaca (testemunha) foi apenas a água de irrigação, ou seja, a água bruta do setor de Horticultura do IFMG-SJE, também utilizada para o preparo de todas as soluções aplicadas. Portanto, os resultados das análises da 1ª à 5ª avaliação das soluções a 0% (Tabela 7) são, respectivamente, os mesmos valores das análises da 5ª à 9ª avaliação da água de irrigação, que estão na Tabela 4, e demonstram contaminação.

Nas cargas microbianas contaminantes das soluções de urina de vaca nas concentrações de 0,5%, 1%, 2% e 4% (Tabela 7), os valores de coliformes totais e coliformes termotolerantes foram muito próximos dos valores da testemunha nesses dois grupos microbianos (Figuras 6 e 7), indicando que as contaminações por coliformes das soluções de urina de vaca originaram-se quase totalmente da água utilizada em seus preparos.

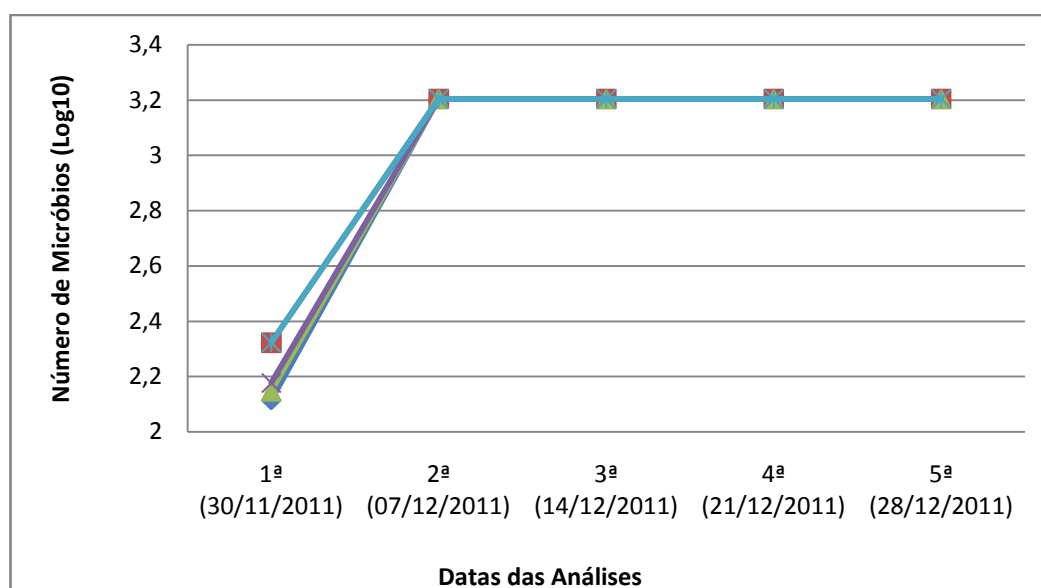


Figura 6. Contagem de coliformes totais (NMP/100mL) presentes nas soluções de urina de vaca nas concentrações de 0% (testemunha) (◆), 0,5% (■), 1% (▲), 2% (×) e 4% (✱), aplicadas em plantas de alface nos experimentos 1 e 2.

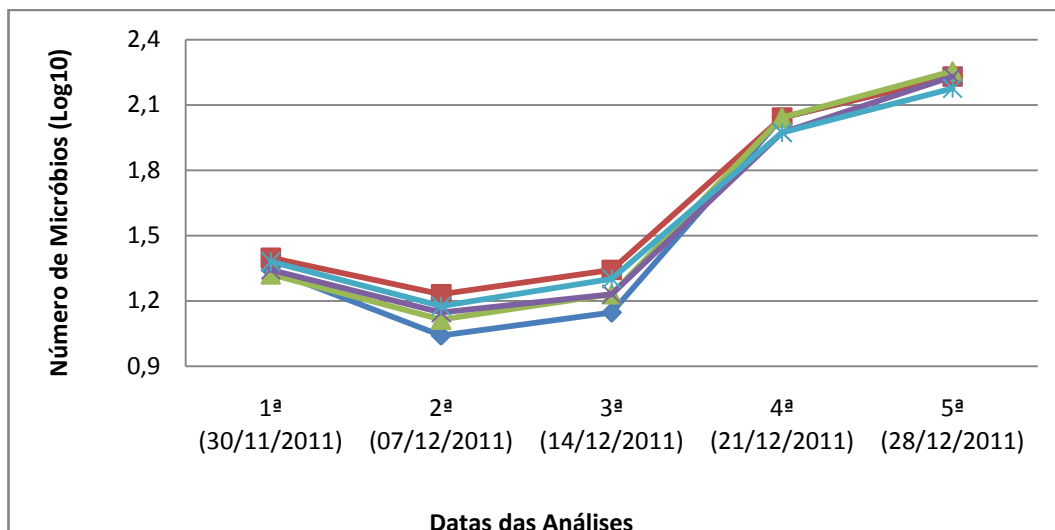


Figura 7. Contagem de coliformes termotolerantes (NMP/100mL) presentes nas soluções de urina de vaca nas concentrações de 0% (testemunha) (◆), 0,5% (■), 1% (▲), 2% (×) e 4% (✱), aplicadas em plantas de alface nos experimentos 1 e 2.

Entretanto, nas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos nas soluções a 0,5%, 1%, 2% e 4%, os valores foram superiores aos da testemunha (Tabela 7), especialmente da primeira à terceira aplicações (Figura 8).

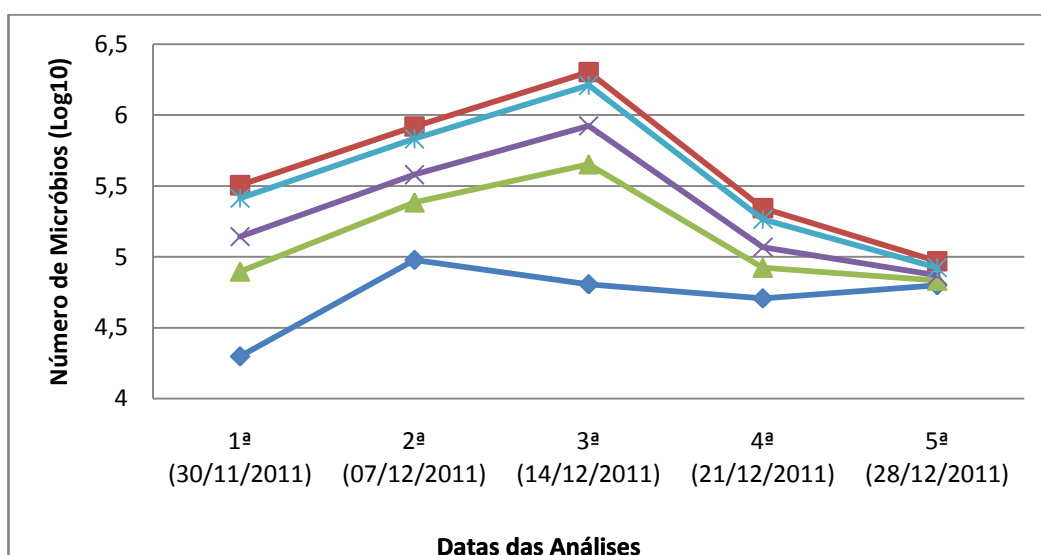


Figura 8. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos (UFC/mL) presentes nas soluções de urina de vaca nas concentrações de 0% (testemunha) (◆), 0,5% (■), 1% (▲), 2% (×) e 4% (✱), aplicadas em plantas de alface nos experimentos 1 e 2.

Nesse caso, deve-se considerar a influência dos valores de aeróbios mesofílicos da urina de vaca utilizada no preparo das soluções (Figura 3), com destaque aos altos valores da 4ª análise, em 07/12/2011 ($1,48 \times 10^7$ UFC/mL), e 5ª análise, em 14/12/2011 ($3,9 \times 10^7$ UFC/mL).

Apesar do baixo teor de urina das soluções (0,5% a 4,0%), as cargas elevadas de micróbios presentes na urina de vaca nesse período de tempo de armazenamento determinaram a maior carga de aeróbios mesófilos nessas soluções, em relação à testemunha. Todavia, a taxa de aeróbios mesófilos na água utilizada no preparo dessas soluções, com contagens sempre no nível de 10^4 UFC/mL nas ocasiões de preparo e aplicação das soluções (Tabelas 4 e 7), contribuiu fortemente, por causa da alta contaminação microbiológica, para que as soluções 0,5% a 4% tivessem contaminações entre 10^4 e 10^6 UFC/mL.

Em relação à urina de vaca, a sua efetiva contribuição contaminante nas soluções preparadas e aplicadas não deve ser superestimada. Visando a compreensão do real significado de contaminação microbiológica pela urina de vaca, na forma como foi empregada nos experimentos 1 e 2, deve-se ressaltar que, devido à sua diluição em água de irrigação no preparo das soluções, as quantidades de urina de fato aplicadas foram pequenas. Assim, na concentração de 0,5%, na 1ª e 2ª aplicações, a quantidade de urina de vaca foi limitada a 0,025 mL/planta em 4,975 mL de água da solução; na 3ª aplicação foi 0,05 mL de urina por planta em 9,95 mL de água; na 4ª e 5ª aplicação, foi 0,1 mL de urina por planta em 19,9 mL de água. Portanto, fica evidenciado que a maioria absoluta dos micróbios presentes nas soluções a 0,5% (Tabela 7) proveio da água utilizada em seu preparo.

Mesmo no caso do preparo das soluções a 4%, devido à diluição em água, as quantidades da urina de vaca compondo as soluções aplicadas nos cultivos dos experimentos 1 e 2 foram limitadas a 0,2 mL/planta em 4,8 mL de água da solução na 1ª e na 2ª aplicações; 0,4 mL/planta em 9,6 mL de água na 3ª aplicação e 0,8 mL de urina por planta em 19,2 mL de água da solução na 4ª e 5ª aplicações. Ou seja, fica

também evidenciado que a maioria absoluta dos micróbios presentes nas soluções a 4% (Tabela 7) foi, na verdade, da água utilizada em seu preparo.

A observação desses números permite afirmar que nos cultivos dos experimentos 1 e 2, em termos de contaminação microbiológica, a contribuição da urina de vaca empregada no preparo das soluções foi extremamente pequena quando comparada com a enorme contribuição contaminante da água utilizada no preparo das soluções aplicadas na alface.

Mas, para a melhor percepção da questão, deve-se considerar que a urina de vaca empregada no preparo das soluções foi utilizada em escala de mililitros, em cinco ocasiões isoladas durante todo o período de cultivo, o que seria ínfima possibilidade de contaminação, embora não desprezível, quando comparada com a imensa capacidade contaminante da água de irrigação, aplicada em escala de litros, em todos os dias de cultivo experimental da alface, desde o preparo das mudas até a colheita das plantas e coleta das amostras das hortaliças para as análises.

4.4.2. Contaminantes nas soluções de urina de vaca utilizadas nos experimentos 3 e 4

As análises microbiológicas realizadas nas soluções de urina de vaca nas concentrações de 0% (testemunha), 2%, 4%, 6% e 10%, aplicadas em alface nos experimentos 3 e 4, também revelaram a presença microbiana (Tabela 8).

Entretanto, nesse caso, diferentemente das soluções preparadas e aplicadas nos experimentos 1 e 2, a urina de vaca utilizada no preparo dessas soluções foi mantida armazenada por 49 dias, ou mais. Em razão disso, houve drástica redução de sua carga microbiana. Por esse motivo, as soluções preparadas com essa urina, apresentaram apenas a carga microbiana da água empregada na solução, pois a carga microbiana da

urina mantida por mais tempo no armazenamento encontrava-se extremamente reduzida e até mesmo zerada (Figuras 4 e 5).

Tabela 8. Valores médios de micróbios presentes nas soluções de urina de vaca preparadas nas concentrações de 0% (testemunha), 2%, 4%, 6% e 10% aplicadas em alface nos experimentos 3 e 4.

Avaliação/ Data	Coliformes Totais (NMP/100 mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100 mL)	Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)
1ª (14/09/2012)	$5,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	$9,0 \times 10^4$
2ª (21/09/2012)	$>1,6 \times 10^3$	$7,0 \times 10^1$	$7,8 \times 10^4$
3ª (28/09/2012)	$>1,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	$1,24 \times 10^4$
4ª (05/10/2012)	$>1,6 \times 10^3$	$9,4 \times 10^1$	$2,17 \times 10^3$
5ª (12/10/2012)	$1,6 \times 10^3$	$4,9 \times 10^1$	$8,8 \times 10^4$

Desse modo, as quantidades de micróbios presentes nas soluções de urina preparadas e aplicadas nos experimentos 3 e 4 não variaram nas concentrações. Portanto, o número de micróbios presentes nessas soluções foi referente ao número de micróbios presentes na água de irrigação usada no preparo das soluções e que corresponde àqueles presentes na água de irrigação analisada nos dias 14/09/2012 a 12/10/2012 (Tabela 5).

Os valores da Tabela 8 evidenciaram a ausência de contribuição da urina de vaca para com a carga microbiana contaminante nas soluções aplicadas na alface nos experimentos 3 e 4. Deixa evidente também a relevante contribuição da água de irrigação como causa de contaminação microbiana das hortaliças.

4.5. Urina de vaca e a produção de alface

Os efeitos das soluções de urina de vaca sobre o desenvolvimento da planta e produção da alface, dos quatro experimentos, são apresentados e discutidos a seguir. As análises conjuntas de algumas

características avaliadas nos experimentos 1 e 2 revelaram a influência da via de aplicação das soluções de urina de vaca sobre o desenvolvimento da alface (via foliar no experimento 1 e via solo no experimento 2). Além disso, conforme os quatro experimentos, as análises de regressão indicaram os efeitos de concentrações de soluções de urina de vaca sobre o crescimento e produção da alface.

4.5.1. Massa de Matéria Fresca de Cabeça (MFCA)

A Massa de Matéria Fresca de Cabeça (MFCA) de alface não diferiu entre as vias de aplicação das soluções de urina de vaca, apesar das plantas que receberam soluções via foliar terem MFCA numericamente superior àquelas que receberam aplicações via solo (Figura 9).

Nas duas vias de aplicação foram observadas respostas lineares crescentes às concentrações das soluções de urina de vaca aplicadas (Figura 10). Aplicação via foliar proporcionou aumento na MFCA de 101,601 g/planta a 137,705 g/planta; enquanto na aplicação via solo, o aumento foi de 94,804 g/planta a 134,612 g/planta (Figura 10).

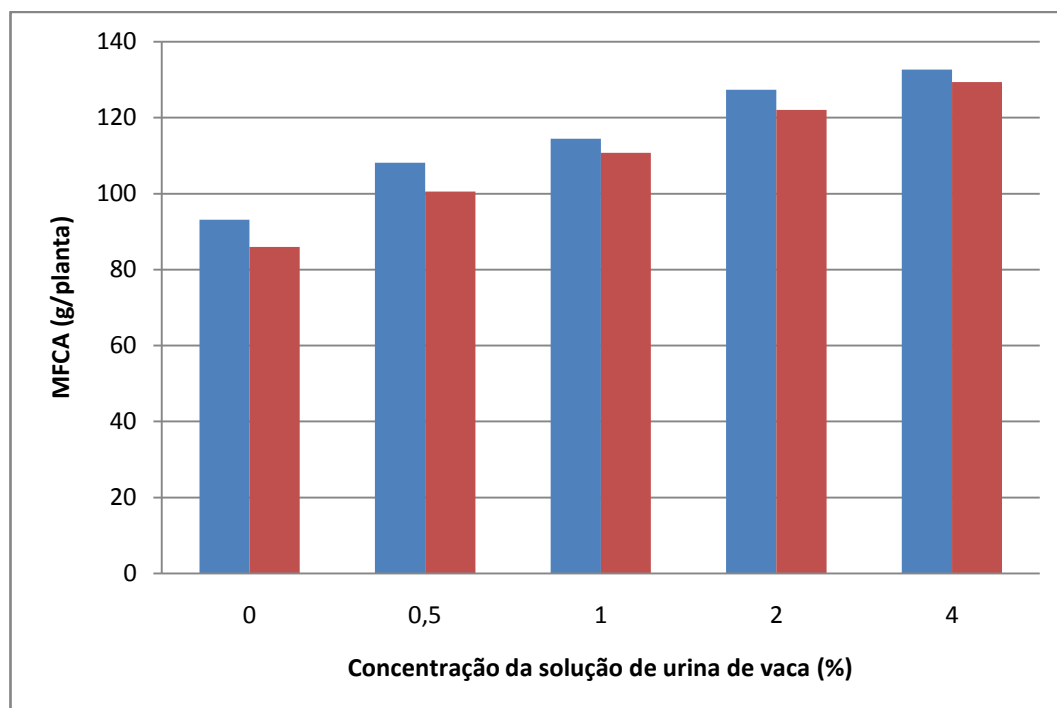


Figura 9. Massa de matéria fresca de cabeça (MFCA) de alface 'Regina 2000' em função da concentração e da via de aplicação das soluções de urina de vaca: foliar (■) no experimento 1 e solo (■) no experimento 2.

OLIVEIRA (2007), também verificou respostas lineares crescentes sobre a MFCA de alface quanto às aplicações de urina de vaca via foliar, nas concentrações de 0,0%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00% e 1,25%, e melhores resultados na concentração 1,25%.

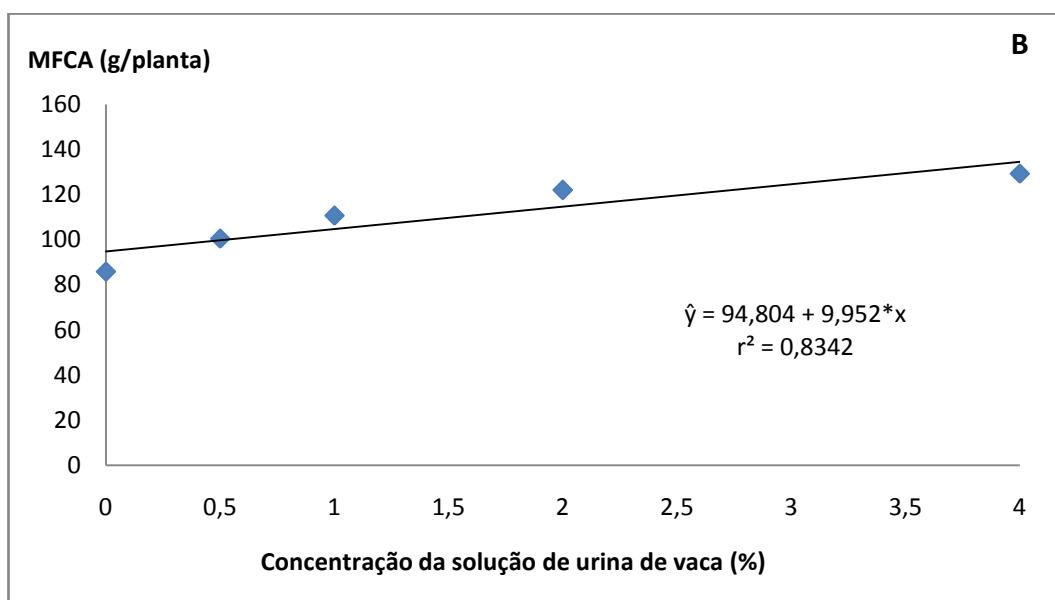
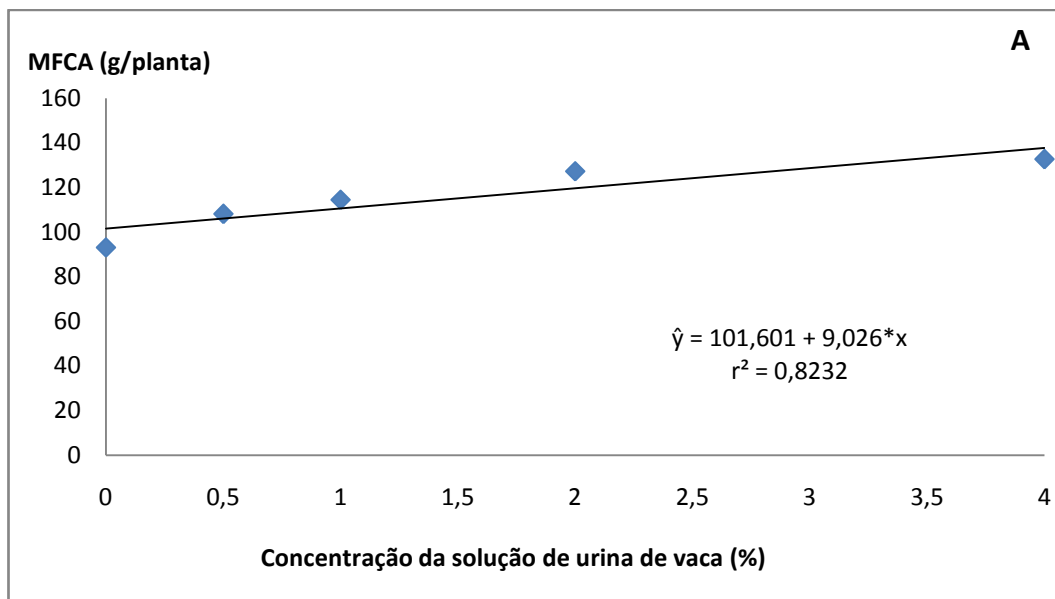


Figura 10. Massa de matéria fresca de cabeça (MFCA) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar no experimento 1 (A) e solo no experimento 2 (B), em alface 'Regina 2000'. ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

ALENCAR *et al.* (2012) também constataram aumento expressivo para massa fresca de cabeça com a utilização de urina de vaca (1% v/v) quando comparados com a testemunha (cultivada apenas com adubação mineral de base). Os autores argumentaram que, além dos possíveis fatores hormonais (promovidos pelo ácido indol-acético), dentre os

componentes da urina de vaca que mais se conhece a ação, está a ureia, sendo uma das responsáveis pelo rendimento das plantas de alface em resposta aos tratamentos realizados com a urina, por ser uma forma do nitrogênio facilmente absorvida pelas folhas das plantas.

No experimento 3, com alface 'Regina 500', e no experimento 4, com alface 'Babá de Verão', ambos com aplicação de soluções de urina de vaca via foliar, também foram observadas respostas às concentrações das soluções de urina de vaca aplicadas, mas com comportamento quadrático (Figura 11).

No experimento 3, o ponto de máximo de MFCA estimado foi 328,65 g/planta obtido com a concentração da solução a 4,03%; portanto, em relação à dose zero, promoveu acréscimo de 44,15 g/planta, ao passar de 0% para 4,03%, ou seja, um aumento de 15,52% (Figura 11). No experimento 4, o ponto de máximo de MFCA estimado foi 278,94 g/planta obtido com a concentração da solução a 4,37%; logo, em relação à dose zero, promoveu acréscimo de 43,67 g/planta, ao passar de 0% a 4,37%, ou seja, o aumento de 18,56% (Figura 11).

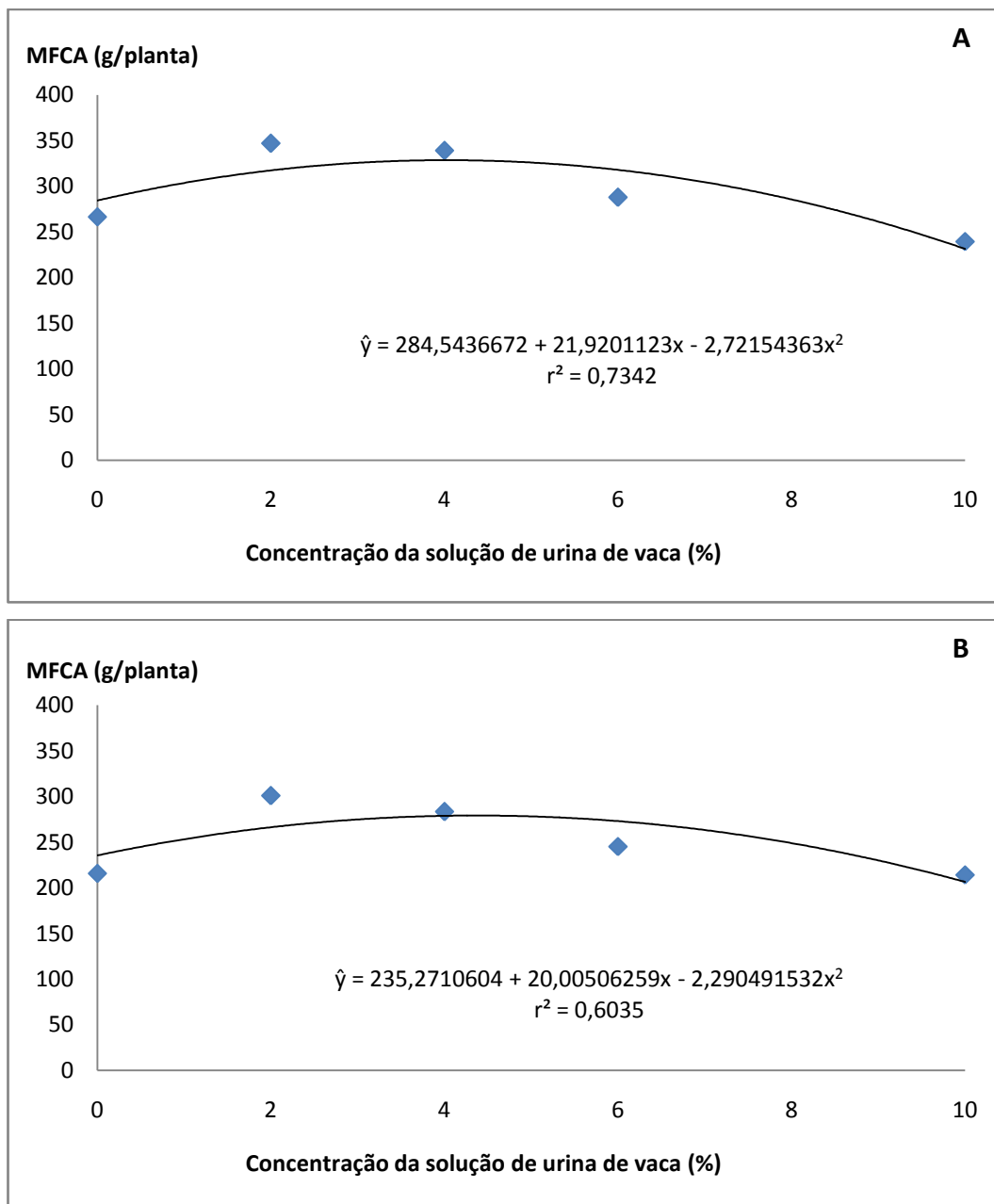


Figura 11. Massa de matéria fresca de cabeça (MFCA) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar, no experimento 3, em alface 'Regina 500' (A) e, no experimento 4, em alface 'Babá de Verão' (B). ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

4.5.2. Número de Folhas por Planta (NFP)

As soluções nas concentrações de 1,0% e de 4,0% aplicadas via foliar (experimento 1) proporcionaram número de folhas por planta (NFP)

de alface maior do que aquelas plantas que receberam a aplicação dessas soluções via solo (experimento 2); entretanto, as diferenças entre as vias de aplicação, ou experimentos, não foram significativas (Figura 12).

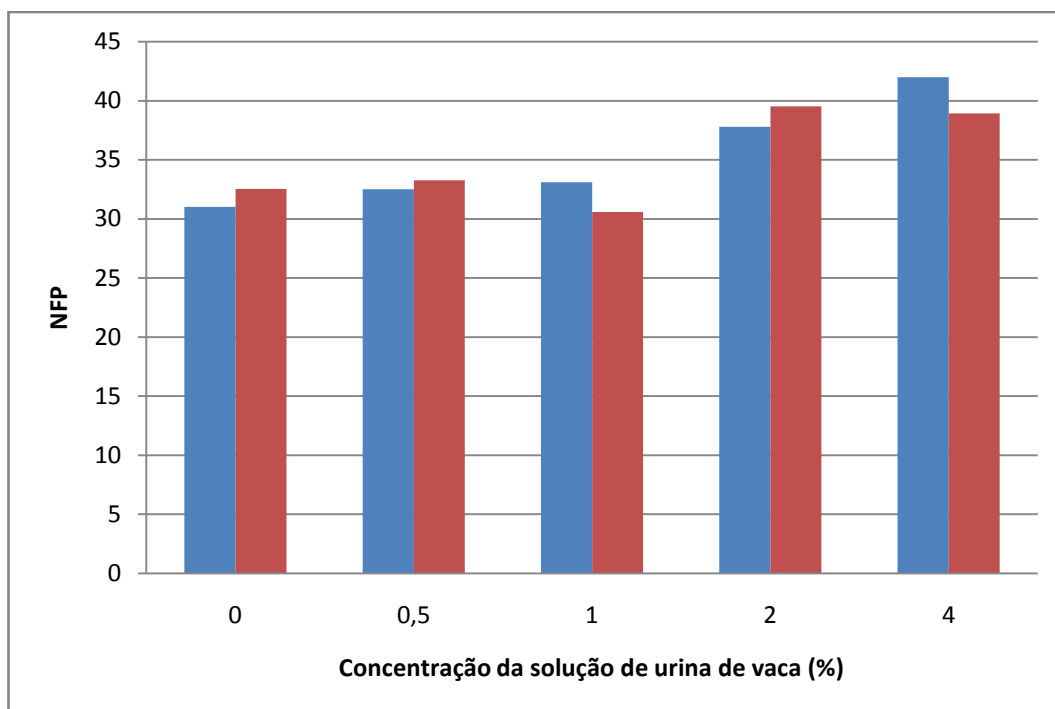


Figura 12. Número de folhas por planta (NFP) de alface 'Regina 2000' em função da concentração e da via de aplicação das soluções de urina de vaca: foliar (■) no experimento 1 e solo (■) no experimento 2.

Em ambas as vias de aplicação, foram observadas respostas lineares crescentes às concentrações das soluções de urina de vaca aplicadas (Figura 13). Na aplicação via foliar (experimento 1), o NFP aumentou de 31,05 para 42,36 folhas/planta ao aumentar a concentração da solução de 0% para 4%; enquanto que via solo, o NFP passou de 32,015 para 39,911 folhas/planta. OLIVEIRA (2007) também verificou respostas lineares crescentes sobre o NFP de alface às aplicações de urina de vaca via solo ao avaliar o efeito de soluções de urina de vaca nas concentrações de 0,00%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00%, 1,25%.

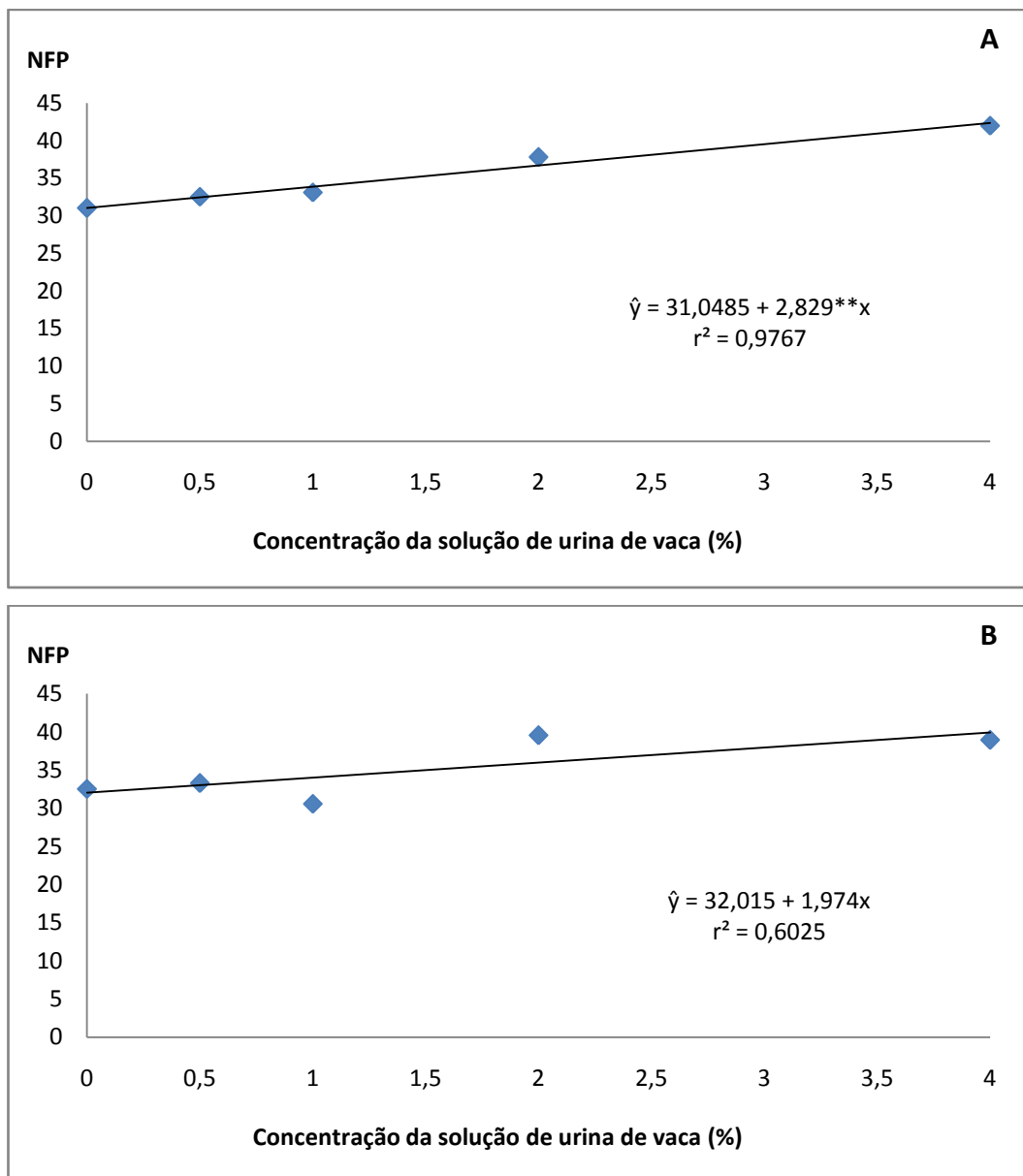


Figura 13. Número de folhas por planta (NFP) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar no experimento 1 (A) e solo no experimento 2 (B), em alface ‘Regina 2000’. ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

Certamente, o maior NFP da alface pulverizada com as maiores concentrações de urina de vaca, nos experimentos 1 e 2, influenciou os resultados de MFCA anteriormente apresentados e discutidos no item 4.5.1. Esses resultados podem ter um significado interessante para o produtor rural, uma vez que nas plantas de alface o NFP é uma

característica importante, visto que o consumidor ao adquirir a hortaliça o faz por unidade e não por peso (MOTA *et al.*, 2001).

Nos experimentos 3 e 4, com alfaces 'Regina 500' e 'Babá de Verão', respectivamente, ambos com aplicação via foliar, foram observadas respostas quadráticas às concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas (Figura 14).

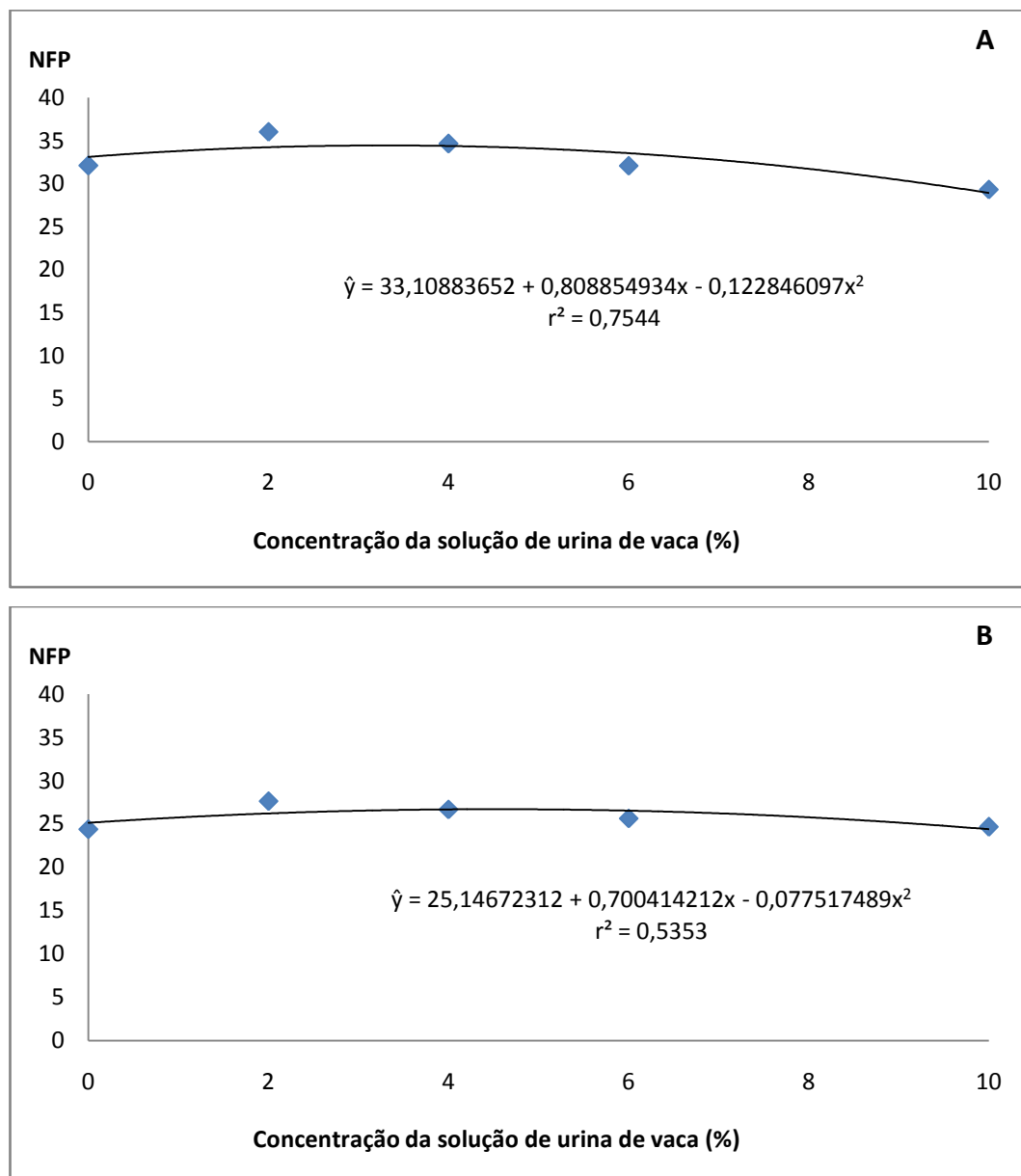


Figura 14. Número de folhas por planta (NFP) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar, no experimento 3, em alface 'Regina 500' (A) e, no experimento 4, em alface 'Babá de Verão' (B). ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

No experimento 3, o ponto de máximo para NFP foi estimado na concentração a 3,38% de urina de vaca, que proporcionou 34,48 folhas/planta, resultando em acréscimo, ao passar de 0% para 3,38%, de 1,37 folhas/planta (Figura 14). No experimento 4, o ponto de máximo estimado na concentração de 4,38%, proporcionou 26,68 folhas/planta, resultando em um acréscimo de 1,53 folhas/planta, ao passar de 0% para 4,38% (Figura 14).

4.5.3. Massa de Matéria Fresca de Folhas (MFF)

A MFF de alface que recebeu aplicação de soluções de urina de vaca via foliar foi numericamente maior do que a MFF de alface que recebeu aplicação via solo, embora a diferença não tenha sido significativa entre as duas vias de aplicação (Figura 15).

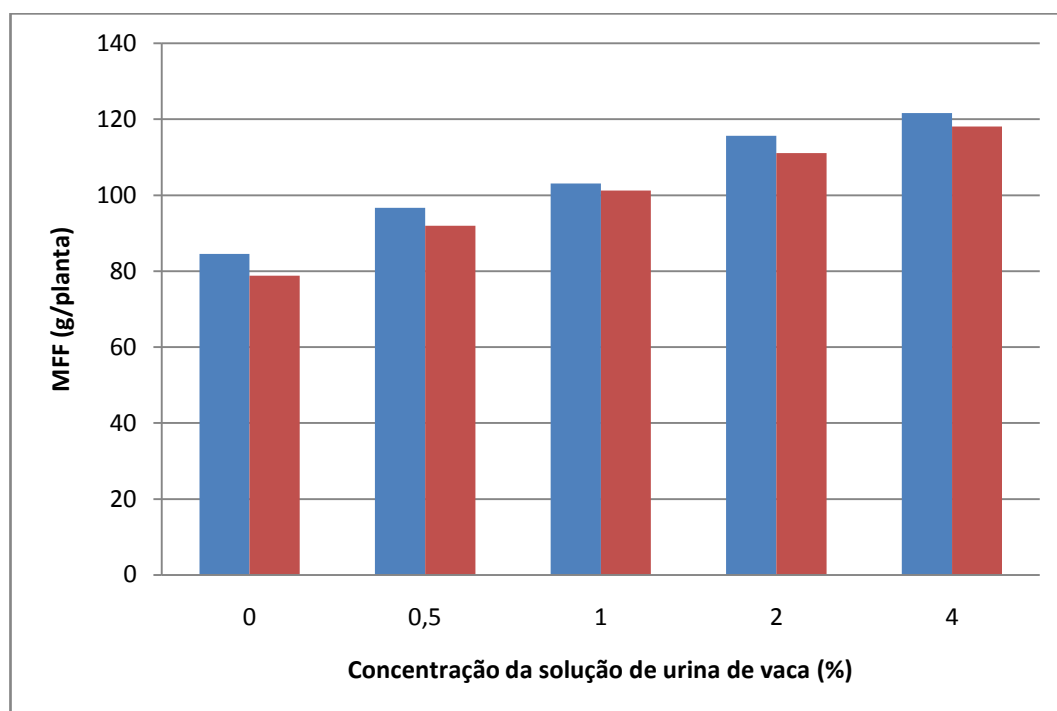


Figura 15. Massa de matéria fresca de folhas (MFF) de alface 'Regina 2000' em função da concentração e da via de aplicação das soluções de urina de vaca: foliar (■) no experimento 1 e solo (■) no experimento 2.

Nos experimentos 1 e 2, foram observadas respostas lineares crescentes às concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas (Figura 16).

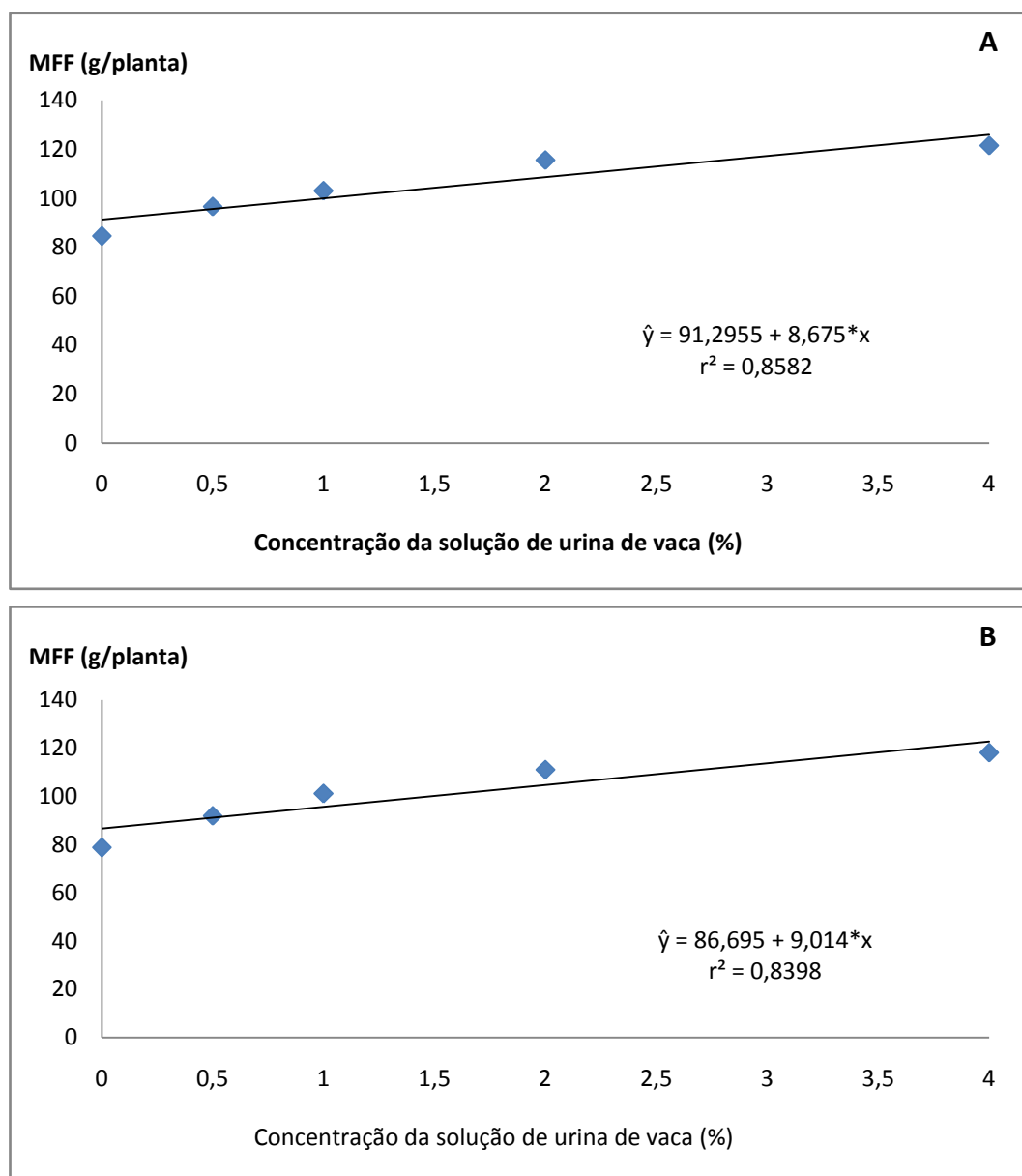


Figura 16. Massa de matéria fresca de folhas (MFF) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar no experimento 1 (A) e solo no experimento 2 (B), em alface 'Regina 2000'. ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

No experimento 1, aplicação via folhas, a MFF aumentou linearmente com o aumento da concentração de urina de vaca, de 0% a

4%, variando de 91,3 a 126,0 g/planta (Figura 16). No experimento 2, aplicação via solo, a MFF aumentou linearmente com o aumento da concentração de urina de vaca, de 0% a 4%, variando de 86,7 a 122,8 g/planta (Figura 16).

O efeito linear crescente às concentrações de urina de vaca via foliar na MFF de alface também foi verificado por OLIVEIRA (2007).

De acordo com a PESAGRO-RIO (2002), um dos efeitos da urina de vaca sobre a alface é hormonal, promovido pelo ácido indol-acético (AIA). O AIA, uma auxina, promove o alongamento celular e funciona como regulador do crescimento da planta (TAIZ & ZEIGER, 2004). Os resultados de aumento de massa fresca nas alfaces pulverizadas com urina de vaca nos quatro experimentos aqui apresentados podem ter sido favorecidos pelo AIA presente na urina, pois, plantas tratadas com auxinas mostram respostas significativas em seu crescimento vegetativo (TAIZ & ZEIGER, 2004).

No experimento 3, com alface 'Regina 500', e no experimento 4, com alface 'Babá de Verão', ambos com aplicação de soluções de urina de vaca via foliar, foram observadas respostas quadráticas, para MFF, às concentrações de urina de vaca aplicadas (Figura 17). O ponto de máximo estimado de MFF de 276,38 g/planta foi verificado na solução a 3,07%, que proporcionou acréscimo, ao passar de 0% para 3,07%, de 25,69 g/planta (Figura 17). No experimento 4, o ponto de máxima da MFF foi verificado na solução a 4,23%, que proporcionou 235,94 g/planta, resultando em acréscimo, ao passar de 0% para 4,23%, de 35,51 g/planta (Figura 17).

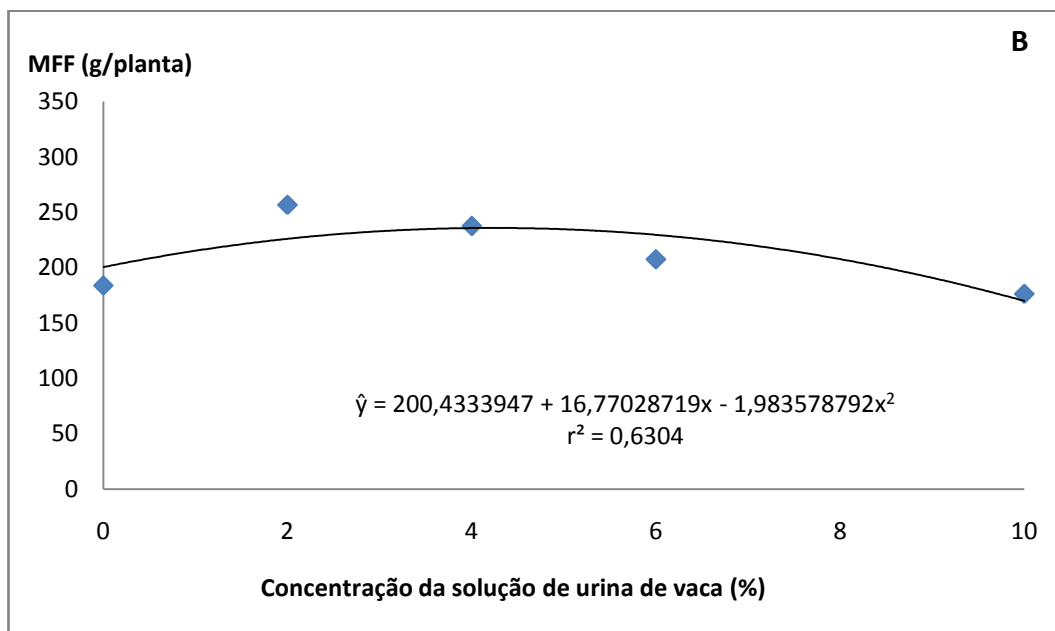
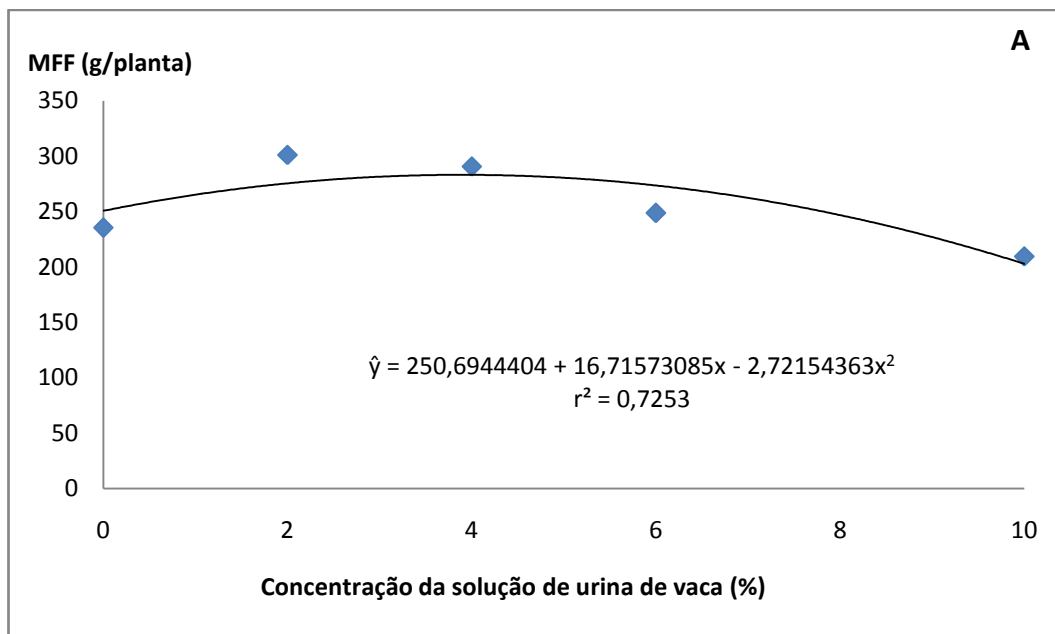


Figura 17. Massa de matéria fresca de folhas (MFF) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar, no experimento 3, em alface 'Regina 500' (A) e, no experimento 4, em alface 'Babá de Verão' (B). ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

4.5.4. Massa Fresca de Caule (MFC)

A MFC de alface que recebeu aplicação das soluções de urina de vaca via foliar nas concentrações a 0,5 e 1%, foi notavelmente maior do

que a MFC de alface que recebeu aplicação dessas soluções via solo; todavia, a diferença entre os experimentos não foi significativa (Figura 18).

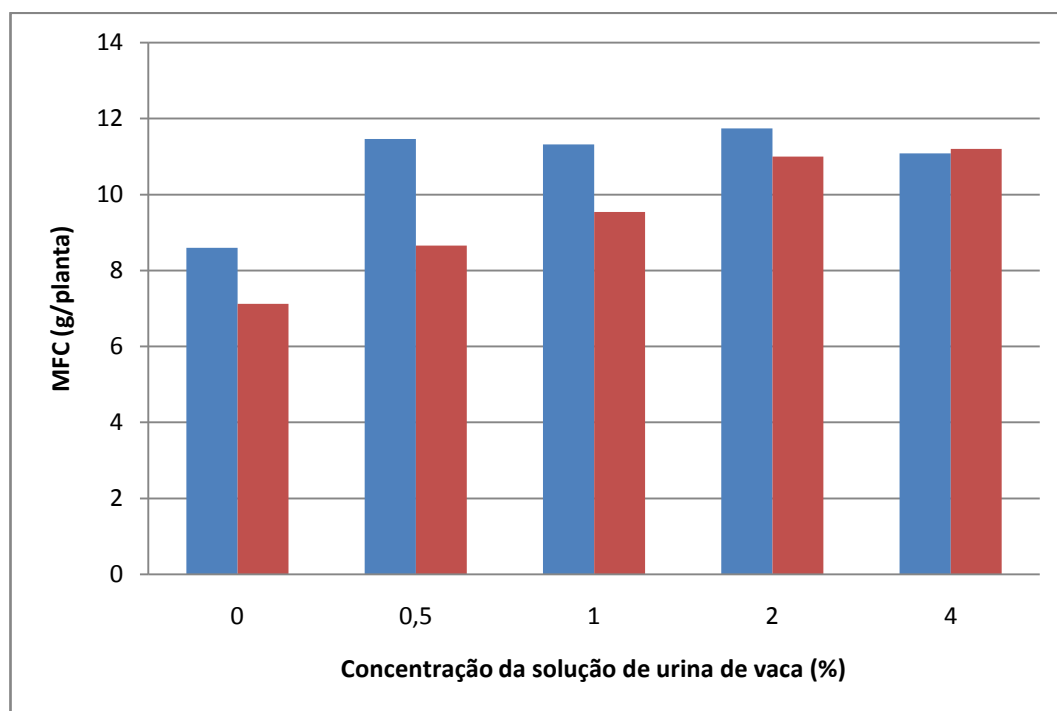


Figura 18. Massa fresca de caule (MFC) de alface 'Regina 2000' em função da concentração e da via de aplicação das soluções de urina de vaca: foliar (■) no experimento 1 e solo (■) no experimento 2.

No experimento 1, com aplicação de soluções de urina de vaca via foliar, e no experimento 2, com aplicação via solo, ocorreu incremento da MFC com aumento da concentração. Em ambos os experimentos, com alface 'Regina 2000', foram observadas respostas quadráticas às soluções de urina de vaca aplicadas (Figura 19).

Via foliar, o ponto de máximo estimado de 12,33 g/planta de MFC foi verificado na solução a 2,41%, resultando em um acréscimo, ao passar de 0% para 2,41%, de 3,03 g/planta (Figura 19). Via solo, o ponto de máximo estimado de 11,58 g/planta de MFC, verificado na solução a 3,09%, resultou no acréscimo, de 0% a 3,09%, de 4,38 g/planta (Figura 19).

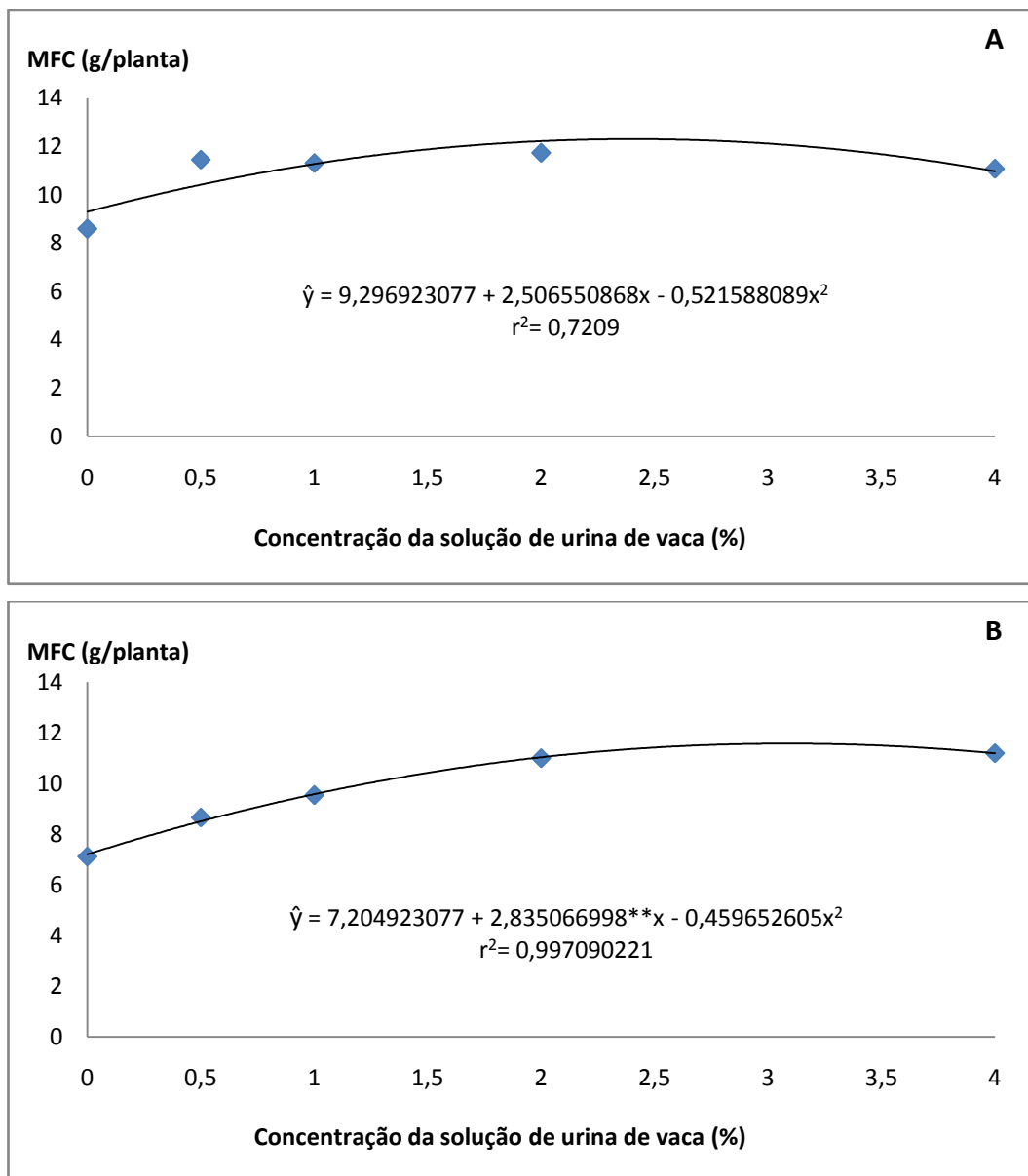


Figura 19. Massa fresca de caule (MFC) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar no experimento 1 (A) e solo no experimento 2 (B), em alface 'Regina 2000'. ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

OLIVEIRA (2007), ao avaliar o efeito de concentrações de soluções de urina de vaca até 1,25% sobre a MFC de alface, verificou respostas lineares crescentes às concentrações via solo e foliar. Caso o autor tivesse avaliado concentrações superiores a 1,25%, provavelmente teria verificado respostas quadráticas com pontos de máximo próximos aos aqui indicados na Figura 19.

No experimento 3, com alface 'Regina 500', e, no experimento 4, com alface 'Babá de Verão', ambos com aplicação de soluções de urina de vaca via foliar, foram observadas respostas quadráticas às concentrações das soluções aplicadas (Figura 20).

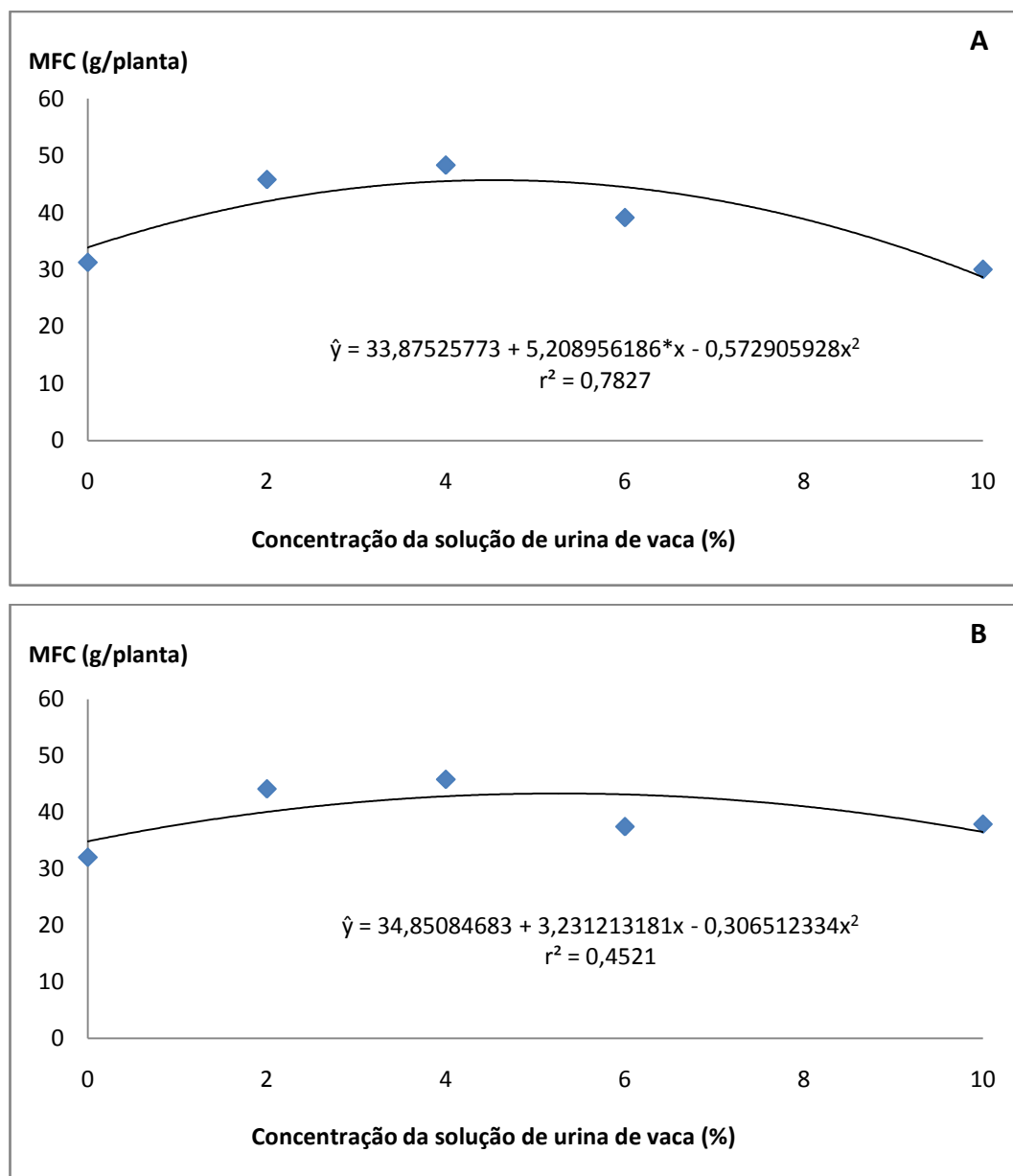


Figura 20. Massa fresca de caule (MFC) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar, no experimento 3, em alface 'Regina 500' (A) e, no experimento 4, em alface 'Babá de Verão' (B). ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

No experimento 3, o ponto de máximo estimado de 45,79 g/planta da MFC foi obtido com a solução de 4,57% de urina de vaca, ou seja, um acréscimo de 11,91 g/planta, ao passar de 0% para 4,57% (Figura 20). No experimento 4, o ponto de máximo estimado de 43,26g g/planta de MFC foi verificado na solução a 5,21%, que resultou em acréscimo, ao passar de 0% para 5,21%, de 8,41 g/planta (Figura 20).

Esses resultados de ganho de massa fresca, certamente estimulados pela ação do AIA presente nas soluções de urina de vaca aplicadas, foram possíveis, também, porque houve nutrientes para favorecer o metabolismo e o crescimento das plantas. Destaca-se, nesse caso, os teores de K e Cl da urina de vaca, com valores de 2666 mg/L de K, e de 1700 mg/L de Cl (OLIVEIRA, 2007). O K da urina de vaca atua sobre a planta, aumentando o aproveitamento de água e a eficiência da adubação nitrogenada (GADELHA, 2003). O Cl presente na urina de vaca aumenta a retenção de água pela planta e o aproveitamento de N (GADELHA, 2003).

4.5.5. Comprimento de Caule (CC)

O CC de alface que recebeu aplicação das soluções de urina de vaca na concentração a 1% via foliar foi maior do que a alface que recebeu aplicação da solução de mesma concentração via solo, mas não houve diferença significativa entre as vias de aplicação (Figura 21).

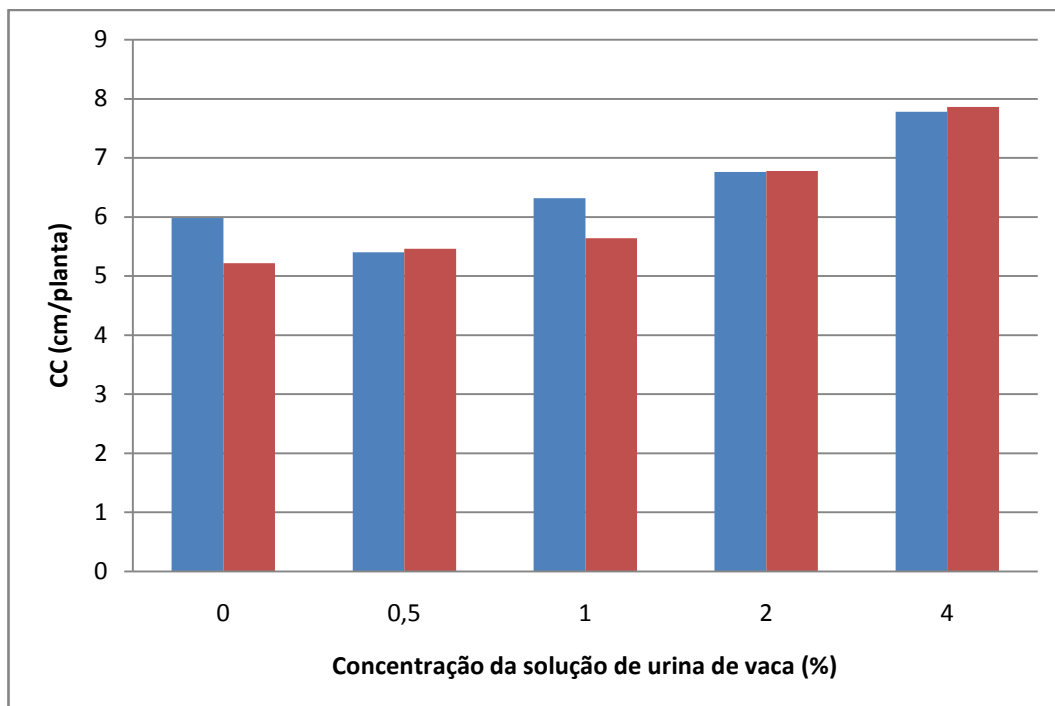


Figura 21. Comprimento de caule (CC) de alface 'Regina 2000' em função da concentração e da via de aplicação das soluções de urina de vaca: foliar (■) no experimento 1 e solo (■) no experimento 2.

Em ambos os experimentos foram observadas respostas lineares crescentes de CC com incremento nas concentrações de soluções de urina de vaca aplicada (Figura 22). Na aplicação via foliar, o CC passou de 5,65 cm na concentração de 0% para 7,77 cm na concentração de 4%. Quando aplicada via solo, o CC passou de 5,15 cm na concentração de 0% para 7,92 cm na concentração de 4%. O AIA pode ter influenciado também no maior crescimento de caule das plantas pulverizadas com soluções de urina de vaca, pois, um dos efeitos desse hormônio sobre o vegetal é a expansão do comprimento (TAIZ & ZEIGER, 2004).

OLIVEIRA (2007), ao avaliar o efeito de concentrações de soluções de urina de vaca (de 0,00%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00% e 1,25%) sobre o CC de alface, também verificou respostas lineares crescentes às aplicações de urina de vaca via solo.

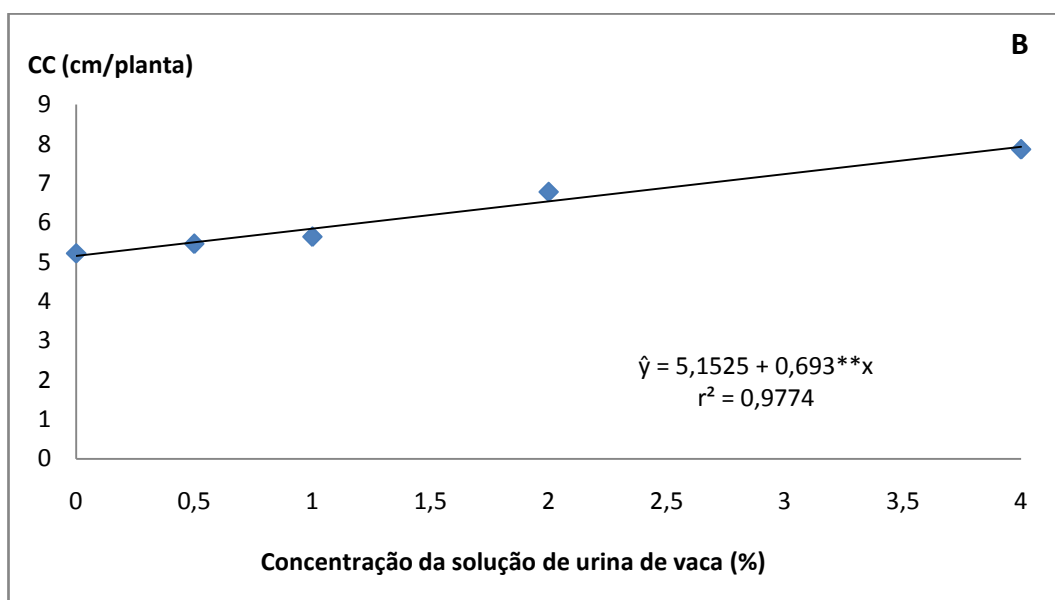
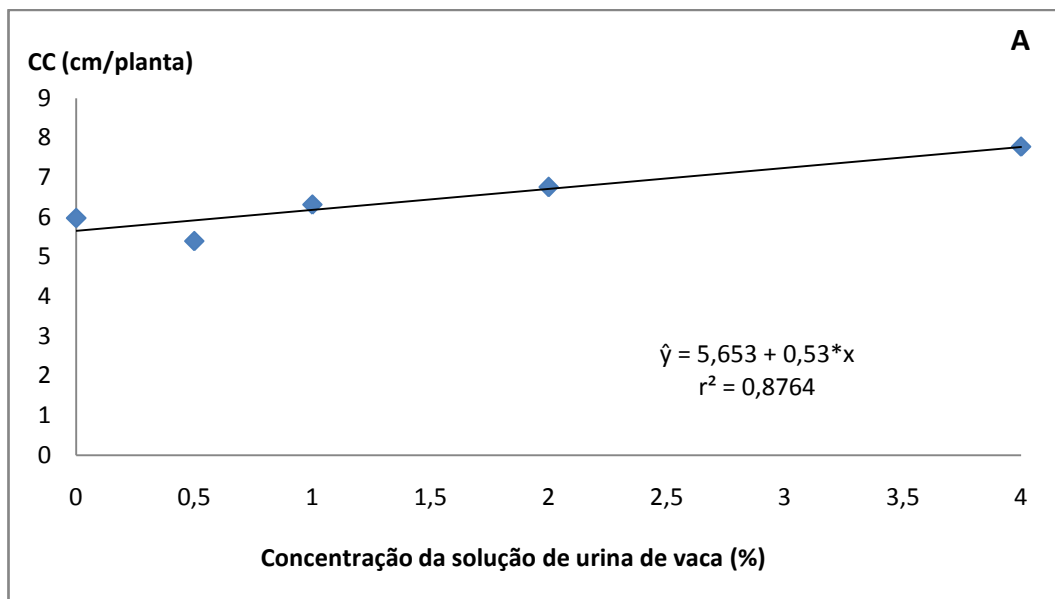


Figura 22. Comprimento de caule (CC) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar no experimento 1 (A) e solo no experimento 2 (B), em alface ‘Regina 2000’. ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

Nos experimentos 3, com alface ‘Regina 500’, e 4, com alface ‘Babá de Verão’, ambos com aplicação das soluções via foliar, foram observadas respostas quadráticas ao incremento das concentrações das soluções aplicadas (Figura 23). Com a alface ‘Regina 500’ (experimento 3), o ponto de máximo estimado em 6,88 cm de CC foi verificado na solução a 3,17% de urina, resultando em um acréscimo, ao passar de 0%

para 3,17%, de 0,6 cm (Figura 23). Com a alface ‘Babá de Verão’, (experimento 4), o ponto de máximo estimado de 3,98 cm foi verificado na solução a 3,75%, resultando em um acréscimo, ao passar de 0% para 3,75%, de 0,28 cm (Figura 23).

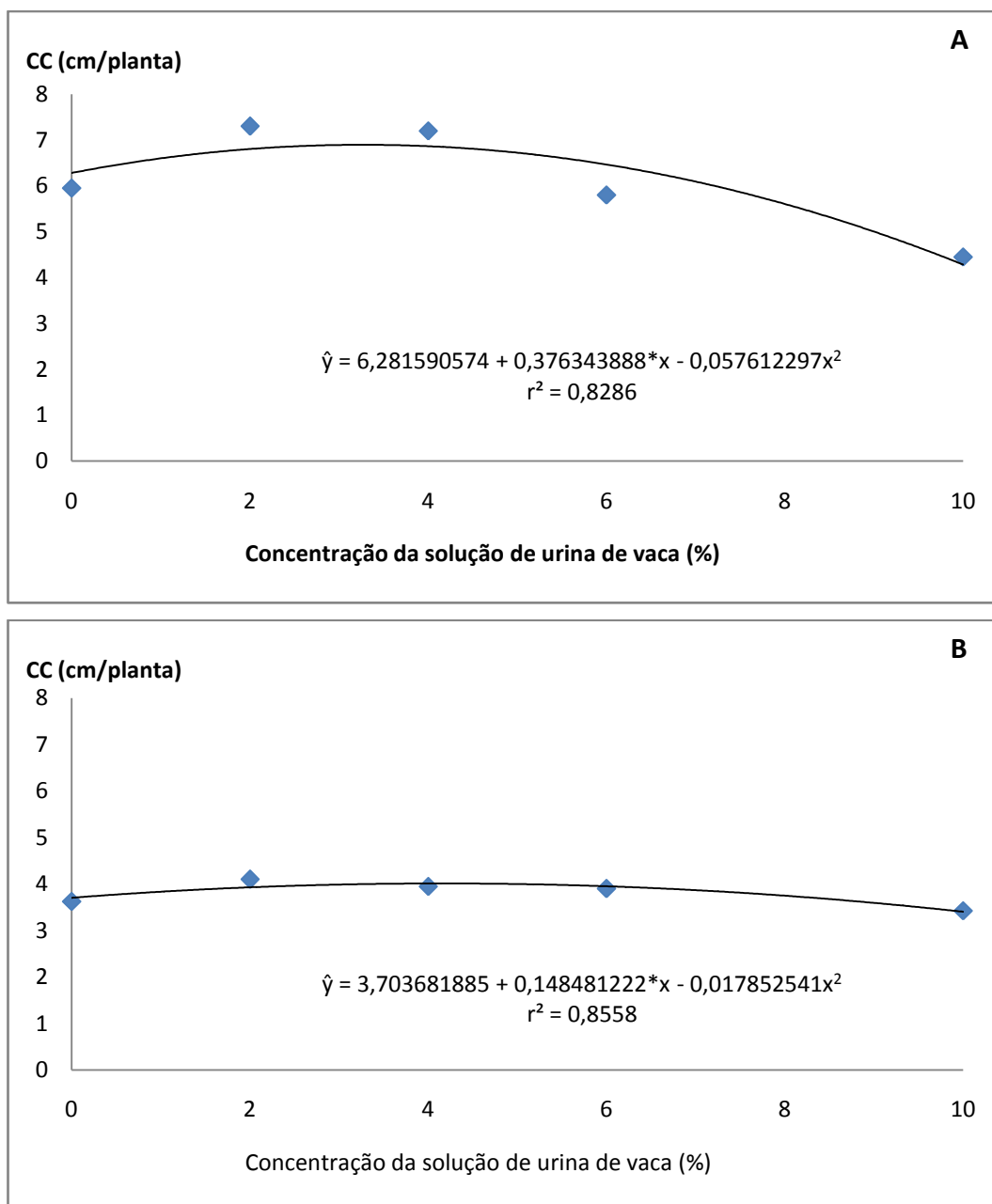


Figura 23. Comprimento de caule (CC) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar, no experimento 3, em alface ‘Regina 500’ (A) e, no experimento 4, em alface ‘Babá de Verão’ (B). ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

OLIVEIRA *et al.* (2012), avaliaram o efeito da urina de vaca no cultivo da beterraba de mesa e obtiveram resultados positivos com estímulo ao crescimento das plantas de beterraba; todavia esse estímulo não pode ser atribuído exclusivamente ao fornecimento de nutrientes às plantas. A conclusão dos autores vai de encontro aos resultados aqui apresentados e discutidos ao longo de todo o item 4.5: no presente trabalho, foi notável e significativa a influência das soluções de urina de vaca sobre o crescimento da alface; e a explicação mais plausível para esses resultados positivos vai muito além da questão nutricional e deixa evidente a ação hormonal benéfica do AIA da urina de vaca sobre o crescimento da hortaliça.

4.6. Análises microbiológicas da alface submetida à aplicação de soluções de urina de vaca

Os resultados das contagens microbiológicas da alface dos experimentos 1 (aplicação via foliar) e 2 (aplicação via solo) foram analisados conjuntamente com o objetivo de se verificar a influência da via de aplicação das soluções de urina de vaca sobre a carga microbiana da hortaliça. Além disso, para os quatro experimentos, foram realizadas análises de regressão para a verificação dos efeitos de concentração de soluções de urina de vaca sobre a taxa de micróbios na alface.

4.6.1. Coliformes Totais

Em todas as amostras, dos quatro experimentos, foram observadas contagens de coliformes totais de 3,041 Log₁₀/100g. Esses resultados, todos coincidentes com os valores máximos possíveis para a metodologia de SILVA *et al.* (2010), indicaram a possibilidade de que a contaminação

tenha sido superior, ou significativamente superior, a $1,1 \times 10^3$ coliformes totais por 100 gramas de alface.

Entretanto, essa contaminação, conforme já discutido anteriormente, pode ter sido provocada pelos contaminantes presentes na água de irrigação. A urina de vaca, possivelmente, não influenciou na carga contaminante de coliformes totais da alface, pois, se para o preparo das soluções aplicadas nos experimentos 1 e 2, a urina utilizada apresentou alguma contaminação por coliformes totais (Figura 2), para o preparo das soluções aplicadas nos experimentos 3 e 4 foi utilizada urina com cargas tendendo a zero e, até mesmo, livre desses micróbios (Figura 4). Além disso, a urina não foi aplicada pura, mas sempre diluída em água.

Nos experimentos 3 e 4, em que se empregou urina de vaca livre de micróbios (Figura 4), a maior concentração usada na solução foi a 10% e nos experimentos 1 e 2, em que se empregou a urina com alguma presença microbiana, a maior concentração foi a 4%. Logo, mesmo nessas ocasiões em que a urina de vaca quase representou algum risco contaminante, sua aplicação ocorreu em diluições capazes de amenizar essa possibilidade em vinte e cinco vezes. Acrescenta-se a tudo isso, o fato de que foi a água utilizada para o preparo das soluções que apresentou permanente contaminação microbiológica (Tabelas 4 e 5).

Portanto, a água de irrigação, presumidamente, contaminada por coliformes totais, aplicada diariamente e em altas lâminas, pode ter sido o fator contaminante suficiente para promover a elevada taxa de contaminação por coliformes totais nas folhas da alface.

4.6.2. Coliformes Termotolerantes

A presença de coliformes termotolerantes em alface 'Regina 2000' que recebeu aplicações das soluções de urina de vaca via foliar não diferiu da presença desses micróbios em alface que recebeu aplicação das mesmas soluções via solo (Figura 24). Portanto, a escolha da via de

aplicação pode ser determinada por outros fatores, como, por exemplo, melhora de alguma característica de desenvolvimento em função da opção adotada.

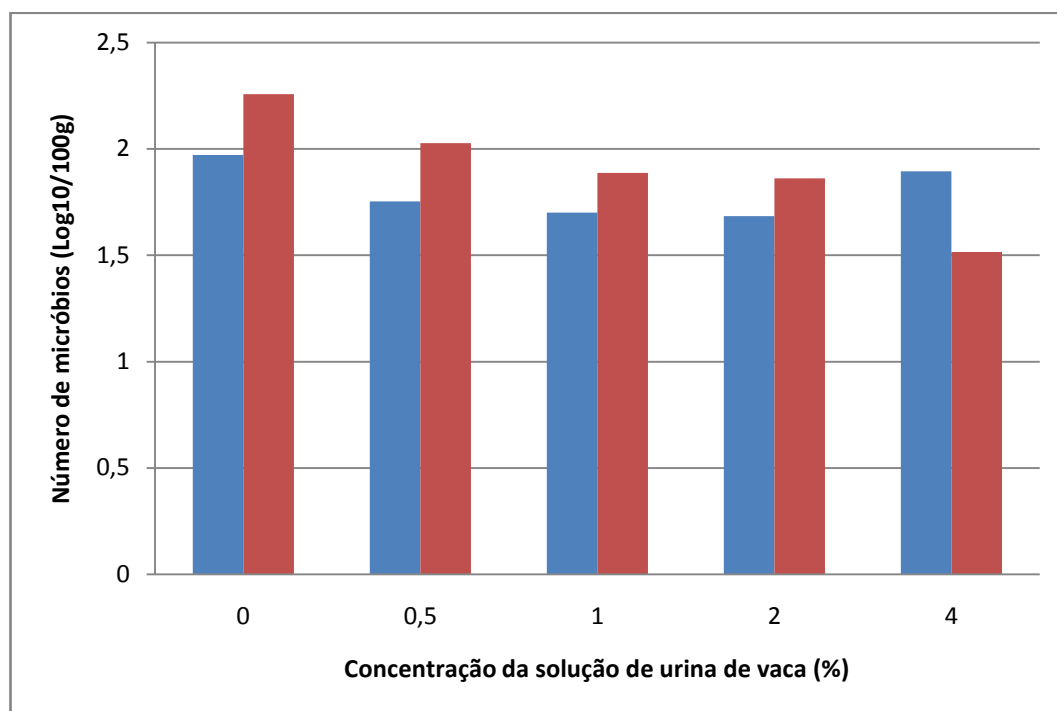


Figura 24. Coliformes termotolerantes (Log10/100g) na alface 'Regina 2000' em função da concentração e da via de aplicação das soluções de urina de vaca: foliar (■) no experimento 1 e solo (■) no experimento 2.

Quando aplicada via foliar, não houve efeito de concentração de solução de urina de vaca sobre a presença de coliformes termotolerantes em alface 'Regina 2000', com média de 1,86 Log10/100g. Todavia, quando aplicada via solo, a resposta foi linear decrescente com incremento da concentração das soluções (Figura 25).

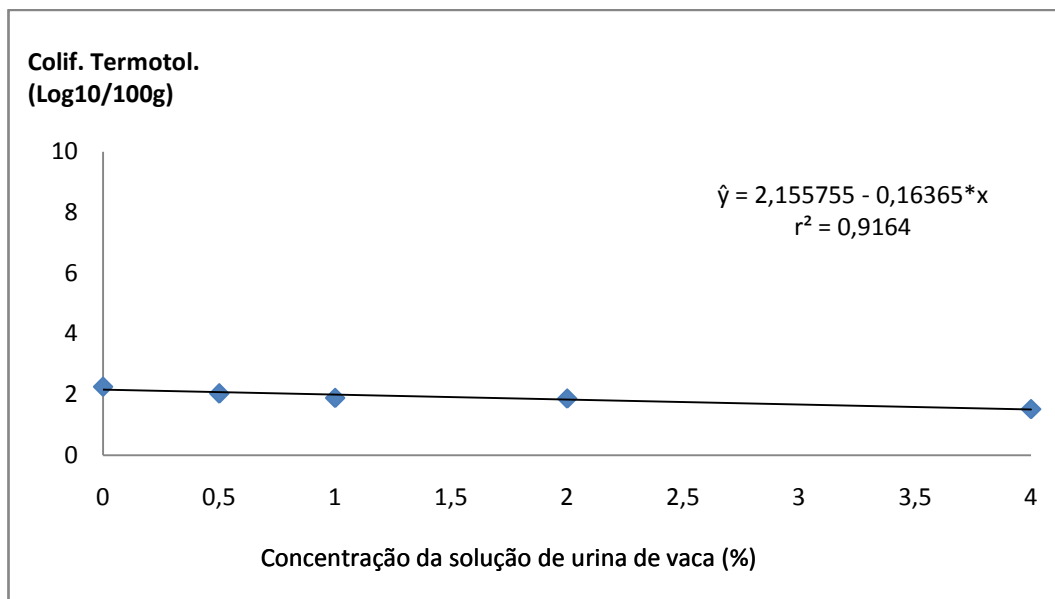


Figura 25. Coliformes termotolerantes (Log10/100g) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas via solo no experimento 2, em alface 'Regina 2000'. ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

Nas alfaces 'Regina 500' (experimento 3) e 'Babá de Verão' (experimento 4), com aplicação de soluções de urina de vaca via foliar, foram observadas respostas quadráticas às concentrações das soluções aplicadas (Figura 26).

Na alface 'Regina 500' (experimento 3), o ponto de mínimo estimado de contaminação por coliformes termotolerantes foi de 1,67 Log10/100g obtido na dose de 6,00%, e o maior valor obtido foi de 2,02 Log10/100g na testemunha (Figura 26). Portanto, nesse experimento, todas as amostras de alface cultivadas com alguma solução de urina de vaca apresentaram taxas de contaminação inferiores às da testemunha.

Na alface 'Babá de Verão' (experimento 4), o ponto de mínimo estimado de contaminação por coliformes termotolerantes foi de 1,71 Log10/100g obtido na dose de 4,00%, e o maior valor obtido foi de 1,87 Log10/100g na testemunha (Figura 26). Nesse experimento, todas as amostras de alface cultivadas com alguma solução de urina de vaca também apresentaram taxas de contaminação inferiores às da testemunha.

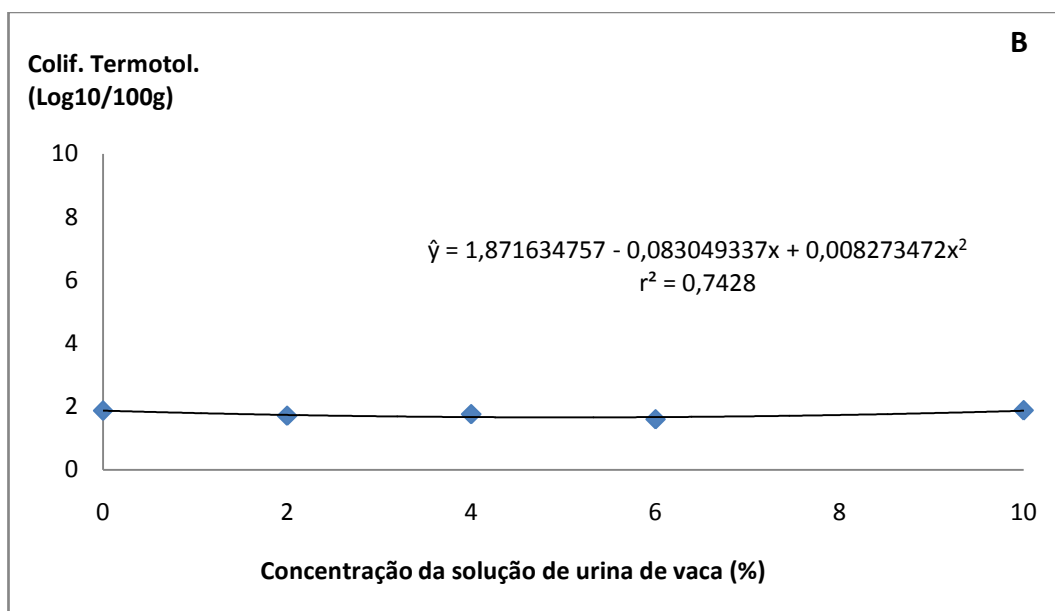
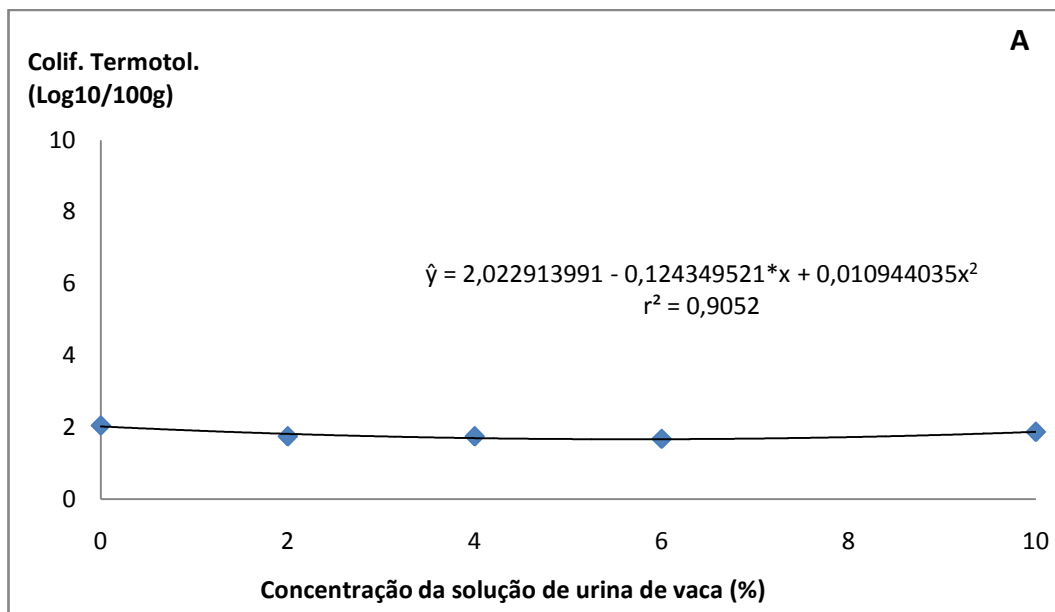


Figura 26. Coliformes termotolerantes (Log10/100g) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar, no experimento 3, em alface 'Regina 500' (A) e, no experimento 4, em alface 'Babá de Verão' (B). ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

Esses valores indicam que a contaminação da alface por coliformes termotolerantes não foi influenciada pelas soluções de urina de vaca aplicadas, porque as alfaces que não receberam as soluções (testemunha) apresentaram taxas de coliformes termotolerantes maiores do que aquelas que receberam. Então, as contaminações verificadas não

foram causadas pelas soluções de urina, mas sim pela água de irrigação que se apresentou contaminada por esses micróbios (Tabelas 4 e 5).

As soluções com as maiores concentrações de urina de vaca aplicadas não resultaram em alface com maiores contagens de coliformes termotolerantes (Figuras 25 e 26). Ao contrário, foi possível notar ausência de efeito (experimento 1) e menores taxas desses micróbios nas hortaliças pulverizadas com soluções de urina de vaca em relação às testemunhas (experimentos 2, 3 e 4), (Figuras 25 e 26). A confirmação desses resultados pode colocar em questão a necessidade de se explicar qual mecanismo está envolvido nesse suposto fenômeno de efeito protetor, para a alface, de certas soluções de urina de vaca contra a contaminação por coliformes termotolerantes. Por enquanto, qualquer conjectura sobre isso seria mera precipitação.

4.6.3. Micro-organismos Aeróbios Mesófilos

A presença de micro-organismos aeróbios mesófilos em alface que recebeu aplicação das soluções de urina de vaca via foliar (experimento 1) não diferiu daquelas que receberam aplicações via solo (experimento 2), (Figura 27). Os valores apresentados revelaram elevada carga contaminante, da ordem de 10^6 micróbios aeróbios mesofílicos por grama de alface, sem diferença significativa entre as duas vias de aplicação avaliadas.

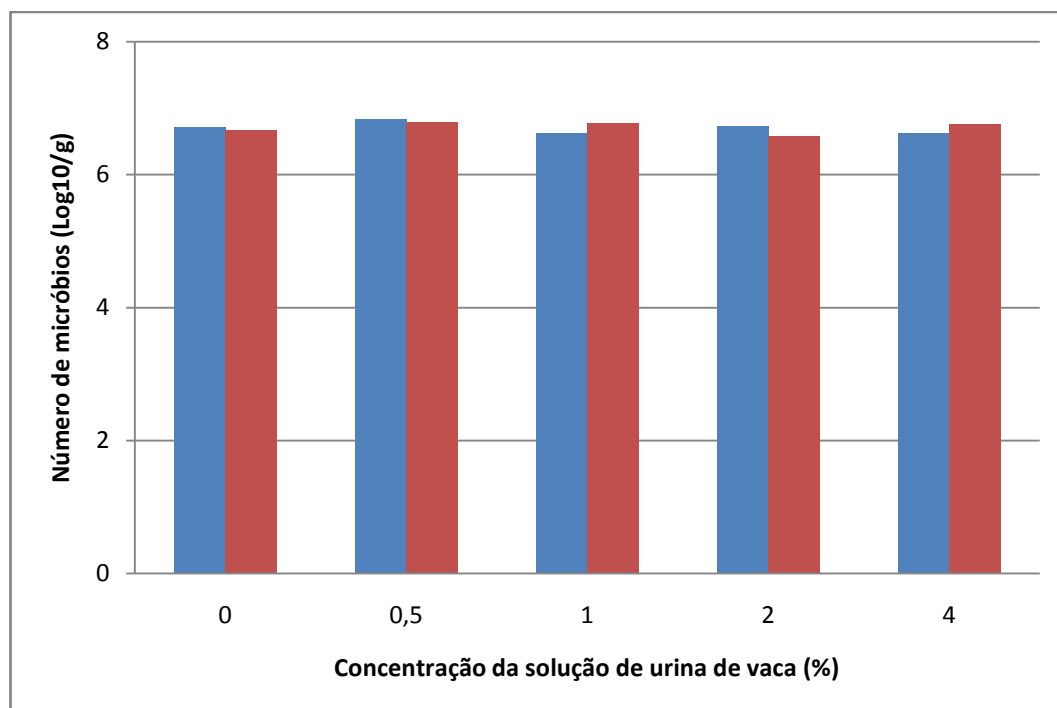


Figura 27. Micro-organismos aeróbios mesófilos (Log10/g) na alface ‘Regina 2000’ em função da concentração e da via de aplicação das soluções de urina de vaca: foliar (■) no experimento 1 e solo (■) no experimento 2.

No experimento 1, com aplicação via foliar, e no experimento 2, com aplicação via solo, ambos com alface ‘Regina 2000’, não foi possível ajuste de equação para concentração de soluções de urina de vaca aplicadas com valores médios de 6,71 Log10/g. Esses resultados reforçaram o entendimento de que as concentrações de soluções de urina de vaca não contribuíram para a elevada taxa contaminante por aeróbios mesófilos verificados para todas as amostras de ambos os experimentos.

No experimento 3, com alface ‘Regina 500’, não houve efeito de concentração de solução de urina de vaca, aplicação via foliar, sobre a presença de micro-organismos aeróbios mesófilos, cujo valor médio foi de 6,77 Log10/g. No experimento 4, com alface ‘Babá de Verão’, aplicação via foliar, foi observada resposta quadrática às soluções de urina de vaca aplicadas (Figura 28).

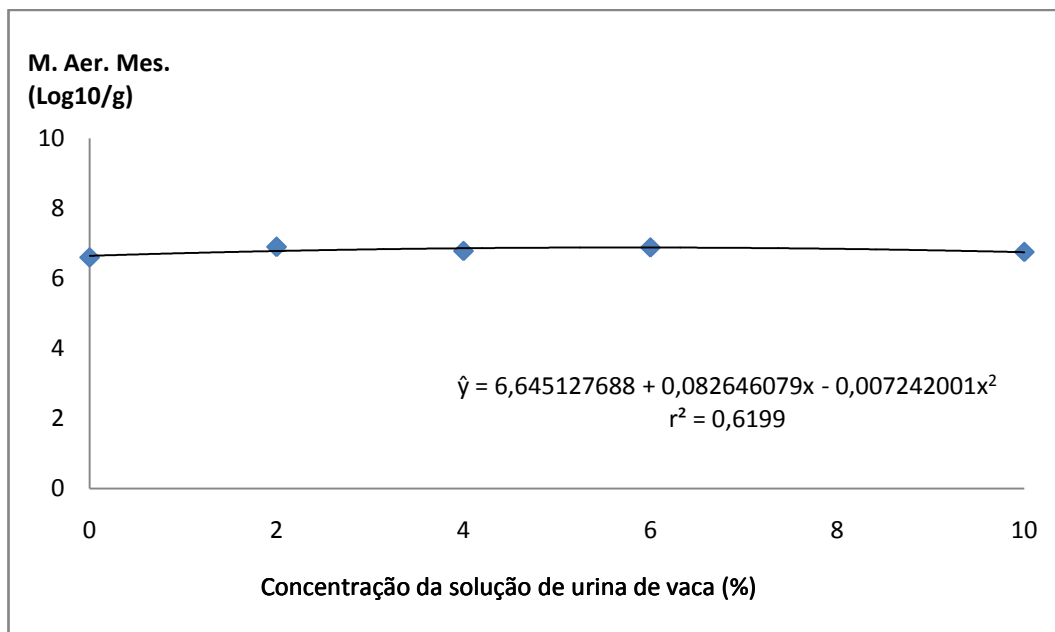


Figura 28. Micro-organismos aeróbios mesófilos (Log10/g) em função das concentrações de soluções de urina de vaca aplicadas vias foliar, no experimento 4, em alface 'Babá de Verão'. ** e *, respectivamente, significativo a 1% e 5% de probabilidade.

No experimento 4, o ponto de máximo de contaminação por aeróbios mesófilos foi 6,88 Log10/g nas parcelas com soluções a 5,71% de urina de vaca. Nesse experimento, entretanto, não é possível afirmar que houve resposta significativa às soluções (Figura 28).

Os valores das análises microbiológicas revelaram elevada carga contaminante, da ordem de 10^6 micróbios aeróbios mesofílicos por grama de alface, sem diferença significativa entre as vias de aplicação avaliadas e praticamente sem efeito, ou efeito muito pequeno, de concentração de solução de urina de vaca (Figura 28). Logo, implica que a fonte dessa alta contaminação foi a mesma em todos os tratamentos dos dois experimentos. Assim, as evidências novamente apontam para a água de irrigação, que foi a mesma água usada todos os dias de cultivo, sempre com considerável carga contaminante (Tabela 4 e 5), com aplicação de lâminas elevadas. Portanto, as soluções de urina de vaca apareceram como fontes de importância inexpressiva em termos de contaminação microbiana para a alface.

Algumas considerações devem ser feitas relacionadas à microbiota da superfície da hortaliça. Deve ser levado em conta que quando a alface recebeu a primeira aplicação de soluções de urina de vaca já possuía microbiota superficial estabelecida, originada não só da água de irrigação, mas também do material de preenchimento das bandejas e dos canteiros para onde foi transplantada, pois, de acordo com JAY (2005), a microbiota superficial de vegetais deve ser a mesma do solo onde esses vegetais cresceram. Os microrganismos comuns em solos utilizados na agricultura aderem às plantas e se tornam parte da microbiota das superfícies dos vegetais frescos.

A primeira aplicação de soluções contendo urina de vaca ocorreu em um determinado momento da primeira semana após o transplante das mudas. Nesse momento, pode-se considerar que a alface já possuía microbiota superficial estabelecida, porque desde o início do preparo das mudas foi exposta ao contato com micróbios do ambiente, em especial com os micro-organismos presentes no substrato das bandejas de mudas, nos solos dos canteiros de cultivo e também na água de irrigação de todos os dias. Esses micróbios do ambiente, os primeiros a entrarem em contato com a alface em formação, ao chegarem à superfície da hortaliça, colonizaram-na e estabeleceram-se como residentes, tornando-se membros de sua microbiota.

De acordo com JAY (2005), os micróbios que sobrevivem em plantas o fazem devido à sua capacidade de aderir à superfície, de forma que não sejam facilmente lavados. Além disso, esses micro-organismos devem ser capazes de prover suas necessidades nutricionais. Entre eles destacam-se bactérias lácticas e as leveduras.

A microbiota normal da alface forma-se exatamente devido ao seu poder de adesão à superfície do vegetal, à sua capacidade de nutrir-se nessa superfície, e, além disso, à sua capacidade de impor antagonismo aos micróbios que, de algum modo, tentam invadir e tomar o seu hábitat. Esse antagonismo imposto pelos micro-organismos residentes na planta contra os invasores é uma verdadeira guerra microbiana por território,

pois, segundo JAY (2005), a microbiota realiza funções de proteção da planta contra possíveis contaminações.

O efeito inibitório de alguns membros da biota alimentar sobre outros organismos é bem conhecido como Interferência Microbiana Geral. Este fenômeno se refere à inibição ou destruição geral e não-específica de um micro-organismo por outros no mesmo hábitat ou meio. O antagonismo láctico é um exemplo específico de interferência microbiana (JAY, 2005).

No caso do antagonismo láctico, as bacteriocinas, a diminuição do pH, os ácidos orgânicos, o H_2O_2 , o diacetil são responsáveis pelo efeito de inibição de patógenos e organismos causadores de deterioração em alimentos. Entre as explicações da interferência microbiana estão: 1) a competição por nutrientes, 2) a competição por sítios de adesão, 3) a alteração desfavorável do ambiente e 4) combinações das três explicações anteriores (JAY, 2005).

Há, portanto, a disposição natural da microbiota estabelecida de combater intrusos microbianos. Nesse sentido, pode-se ressaltar que, quando cada planta cultivada nos experimentos 1 e 2 recebeu as cinco aplicações das soluções de urina de vaca, em intervalos de sete dias entre cada uma, já possuía uma microbiota pronta para combater micro-organismos invasores estranhos. Caso houvesse carga contaminante nas soluções de urina de vaca, constituída por micróbios diferentes dos residentes na microbiota da hortaliça, ela seria prontamente combatida até ficar bem contida ou ser eliminada da superfície da alface.

Um outro aspecto favorável à microbiota da alface, uma das razões de seu poder defensivo contra possíveis contaminantes, de sua força contra invasores microbiológicos estranhos, é que, enquanto ela, microbiota, teve a oportunidade de renovar-se e se fortalecer todos os dias por causa da água de irrigação, que pode ter sido a sua grande fonte renovadora, essa microbiota diariamente revigorada e fortalecida só teve de dar combate aos supostos contaminantes das soluções de urina de vaca em cinco momentos isolados e distantes sete dias cada um do outro.

Ou seja, as possíveis contaminações presentes nas doses de mililitros das soluções de urina de vaca, dispersas no tempo, chegaram a uma superfície de alface e depararam-se com um sistema microbiológico defensivo preparado para o combate.

Essas podem ser algumas das explicações para a fraqueza dos prováveis contaminantes veiculados pela urina de vaca: porque não foram competentes o suficiente para competir por nutrientes e por sítios de adesão, não puderam estabelecer-se como residentes na superfície da alface; porque não foram resistentes o bastante para suportar as alterações desfavoráveis do ambiente causadas pela microbiota, não sobreviveram na hortaliça; porque chegaram em número menor e em baixa frequência à superfície da planta, foram detidos pela microbiota da alface; porque eram poucos, esporádicos e impotentes diante do poder defensivo da microbiota estabelecida, não sobreviveram como grupo residente na hortaliça.

É bastante provável que nos experimentos 3 e 4 não houve contaminação microbiana da alface a partir da urina de vaca utilizada nas soluções aplicadas. Os micróbios dessas soluções eram micróbios da água utilizada em seu preparo. Mas, na hipótese de que alguma quantia microbiana próxima a zero tenha sido veiculada da urina nas soluções até as hortaliças, esses hipotéticos micróbios só encontrariam esperanças de sobrevivência na superfície da alface caso fossem dos mesmos grupos estabelecidos na hortaliça. Caso contrário, não resistiriam à força combativa da microbiota.

4.7. Higienização da alface no Município de São João Evangelista, Minas Gerais

A pesquisa sobre higienização de alface revelou que 56% da população de São João Evangelista, Minas Gerais, incluindo domicílios, lanchonetes e restaurantes, lava a alface apenas em água pura; 26% da

população, além de lavar a alface em água pura, sanitiza a hortaliça em solução com vinagre; 16% da população, após lavar a alface, realiza a sanitização em solução com hipoclorito de sódio; 2% da população sanitiza alface em solução com suco de limão; e, um pouco mais de 0% da população, sanitiza a hortaliça em solução com bicarbonato de sódio (Figura 29A).

A pesquisa sobre higienização de alface nos domicílios revelou que 58% da população de São João Evangelista, Minas Gerais, lava a alface apenas em água pura; 23% da população, além de lavar a alface em água pura, sanitiza a hortaliça em solução com vinagre; 17% da população, após lavar a alface, realiza a sanitização em solução com hipoclorito de sódio; 2% da população sanitiza alface em solução com suco de limão; e, um pouco mais de 0% da população, sanitiza a hortaliça em solução com bicarbonato de sódio (Figura 29B).

A pesquisa sobre higienização de alface nas lanchonetes e restaurantes revelou que 27% dos estabelecimentos de São João Evangelista, Minas Gerais, lava a alface apenas em água pura; 73% dos estabelecimentos, além de lavar a alface em água pura, sanitiza a hortaliça em solução com vinagre (Figura 29C).

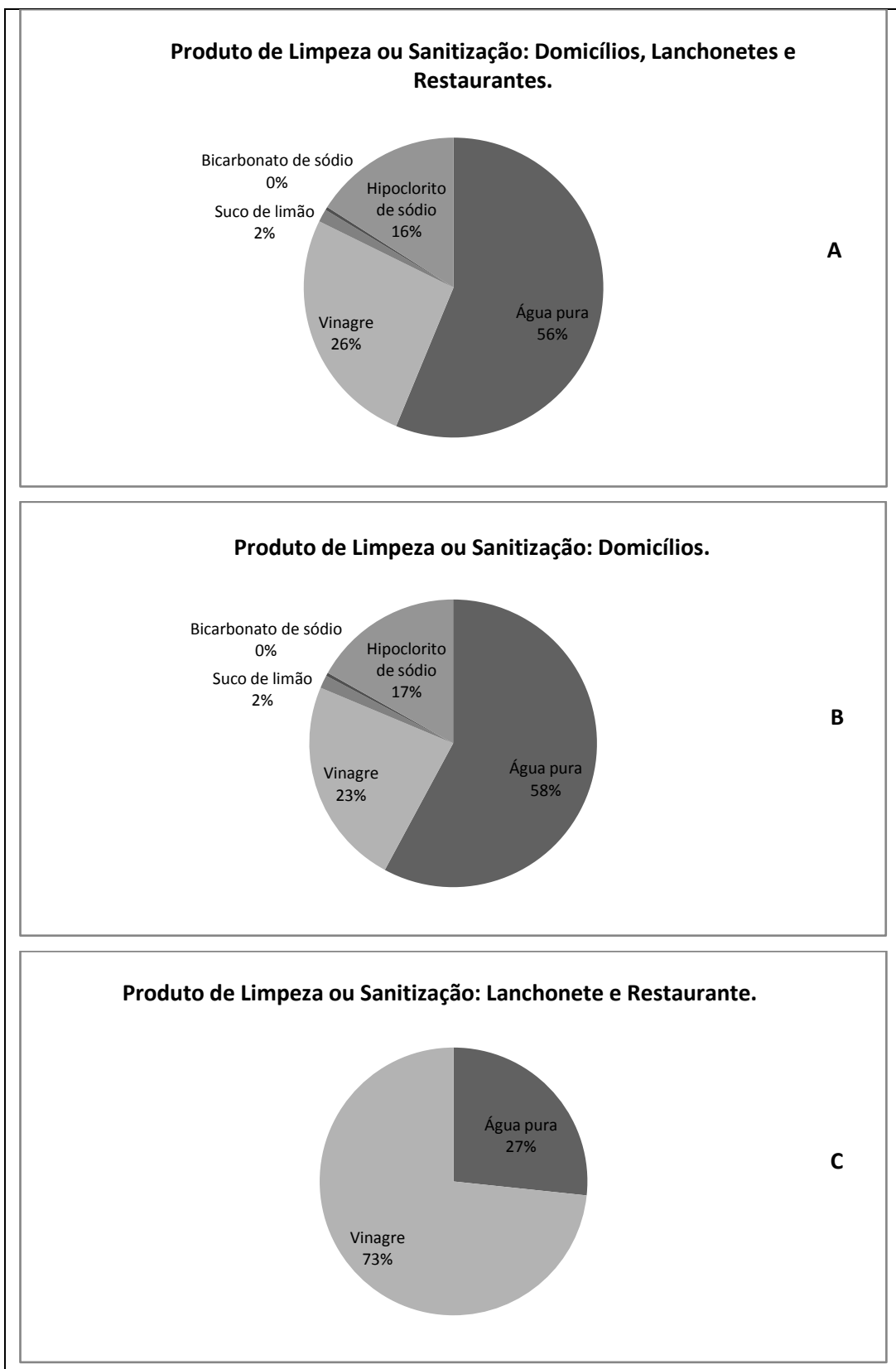


Figura 29. Resultados da pesquisa em São João Evangelista, Minas Gerais, outubro de 2011, sobre formas de higienização de alface: resultado geral com 288 entrevistados (A); 273 entrevistados em domicílios (B); pesquisa em 15 lanchonetes e restaurantes (C).

Os resultados da pesquisa sobre higienização da alface (Figuras 29A, B e C), revelaram que a maioria da população não sanitiza a alface antes de consumi-la, limitando-se a lavá-la em água pura. Esses resultados revelaram uma falha higiênica no preparo e consumo da hortaliça em uma cidadezinha que, embora não represente a realidade nacional, pode indicar uma propensão de todo o povo de não consumir hortaliças corretamente higienizadas. A partir desses resultados, foram incluídas entre as atividades dos quatro experimentos aqui apresentados as análises microbiológicas da alface lavada apenas em água pura.

Os resultados das contagens microbiológicas da alface dos quatro experimentos, não lavada e lavada apenas em água pura, foram analisados conjuntamente com o objetivo de se verificar a influência do procedimento de limpeza sobre a carga microbiana da hortaliça. A seguir, são apresentados os resultados e as suas discussões.

4.8. Análise microbiológica da alface lavada e não lavada

4.8.1. Coliformes totais em alface lavada apenas em água pura

Todas as amostras de alface lavada em água pura apresentaram contagens de coliformes totais de 3,041 Log₁₀/100g, independentemente da forma de cultivo, sem ou com aplicação de solução de urina de vaca via foliar ou solo e da concentração da solução.

Esses resultados são iguais aos valores observados para as amostras de alface não lavada. Comprova que a contaminação da alface, dos quatro experimentos, superou de modo significativo a quantia de 1,1 x 10³ coliformes totais por 100 gramas de alface, pois, segundo PARISH *et al.* (2003), a simples lavagem do produto em água pura reduz as populações microbianas de superfície, embora essa redução seja geralmente inferior a 1 ciclo logarítmico. Logo, pode-se deduzir que a carga contaminante das alfaces não lavadas foi da ordem de 10⁴, 10⁵, ou

mais, coliformes totais por 100 gramas de alface. Além disso, constatou-se que lavar alface apenas em água pura não promove a total remoção dos coliformes totais. Na verdade, lavá-la apenas em água pura é algo arriscado que permite a permanência de taxas de contaminação capazes de expor os comensais de alface aos perigos microbiológicos.

4.8.2. Coliformes termotolerantes em alface lavada apenas em água pura

Alfaces que receberam soluções de urina de vaca via foliar ou via solo, lavadas ou não em água pura, embora tenham apresentado diferenças na quantidade de coliformes termotolerantes, não apresentaram diferença significativa quanto a presença desses micróbios (Figura 30A e B).

Observa-se também que, após a lavagem em água pura, houve redução da taxa contaminante, mas não o suficiente para livrar a alface do experimento 1 do risco microbiológico, pois as contagens permaneceram em valores entre 10^1 e 10^2 coliformes termotolerantes por 100 g de alface (Figura 30A).

No experimento 2, embora não diferindo estatisticamente, após a lavagem em água pura, a taxa contaminante reduziu um ciclo logarítmico apenas em três casos: houve redução de valores da ordem de 10^2 a 10^1 na testemunha e nas amostras da concentração de 0,5% de urina; e na concentração de 4% de urina de vaca, a redução foi da ordem 10^1 a 10^0 . Contudo, nesses três casos, as reduções não levaram a alface à condição de segurança microbiológica, pois o perigo ao comensal não foi eliminado. Nos outros dois casos, nas amostras das soluções a 1% e a 2% de urina de vaca, embora tenha havido redução de contaminação microbiana, as contagens permaneceram em valores entre 10^1 e 10^2 coliformes termotolerantes por 100 g de alface.

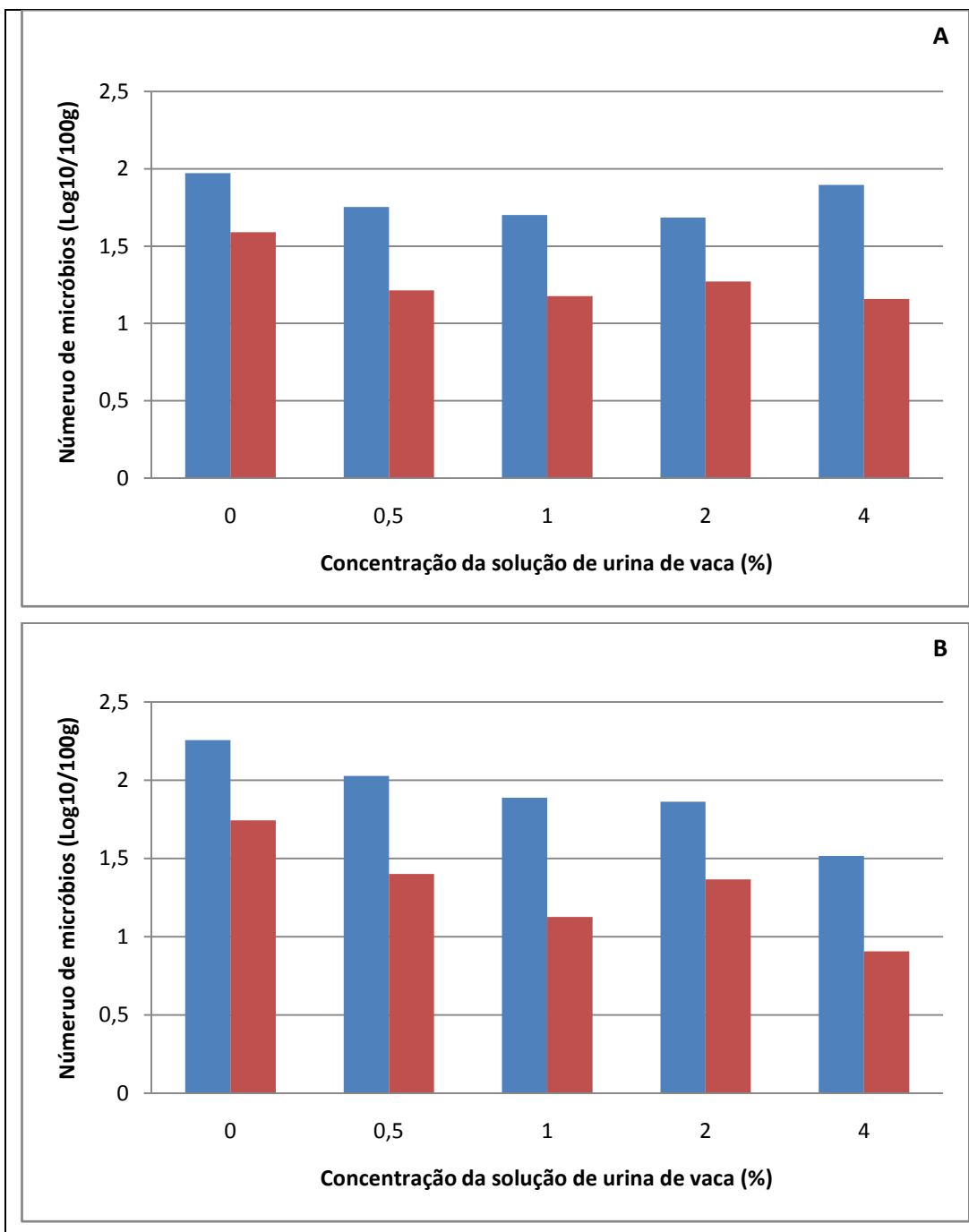


Figura 30. Coliformes termotolerantes (Log₁₀/100g) na alface 'Regina 2000' dos experimentos 1 (A) e 2 (B): não lavada (■) e lavada com água pura da ETA/IFMG-SJE (■).

Esses resultados evidenciam que lavar a hortaliça apenas em água pura não é o bastante para promover uma alimentação segura, livre de contaminação microbiológica por coliformes termotolerantes.

A lavagem em água pura das alfaces obtidas do experimento 3 (aplicação das soluções de urina via foliar), reduziu o número de coliformes termotolerantes em todas as amostras avaliadas, mas tal redução não foi significativa em relação às alfaces não lavadas (Figura 31A). Nas soluções de concentrações a 2%, 4%, 6% e 10% de urina de vaca, embora após a lavagem em água pura a taxa contaminante tenha reduzido de forma não significativa, as contagens permaneceram em valores próximos a 10^1 coliformes termotolerantes por 100 g de alface.

Nas amostras controle, houve redução da ordem de 10^2 para 10^1 micróbios por 100 g de alface. Entretanto, nesse caso de redução de um ciclo logarítmico, observou-se que as alfaces controle continuaram com a maior taxa contaminante por coliformes termotolerantes entre todas as amostras de alface lavadas (Figura 31A). Todos esses resultados reforçaram o entendimento da contaminação da alface pela água de irrigação e de que as hortaliças lavadas apenas em água pura não oferecem segurança microbiológica para os seus comensais.

Embora a lavagem em água pura de alfaces que receberam soluções de urina de vaca via foliar do experimento 4 tenha promovido a diminuição da contagem microbiológica, não houve redução significativa da presença de coliformes termotolerantes em relação às alfaces não lavadas (Figura 31B). Pode-se verificar que, após a lavagem em água pura, a taxa contaminante reduziu de um ciclo logarítmico apenas em dois casos: houve redução de valores da ordem de 10^1 para 10^0 nas amostras cultivadas com soluções a 4% e a 6% de urina de vaca (Figura 31B). Mesmo assim, nesses dois casos, as reduções também não foram suficientes para livrar a alface da contaminação por coliformes termotolerantes. Nos demais casos, as contagens permaneceram em valores entre 10^1 e 10^2 coliformes termotolerantes por 100 g de alface.

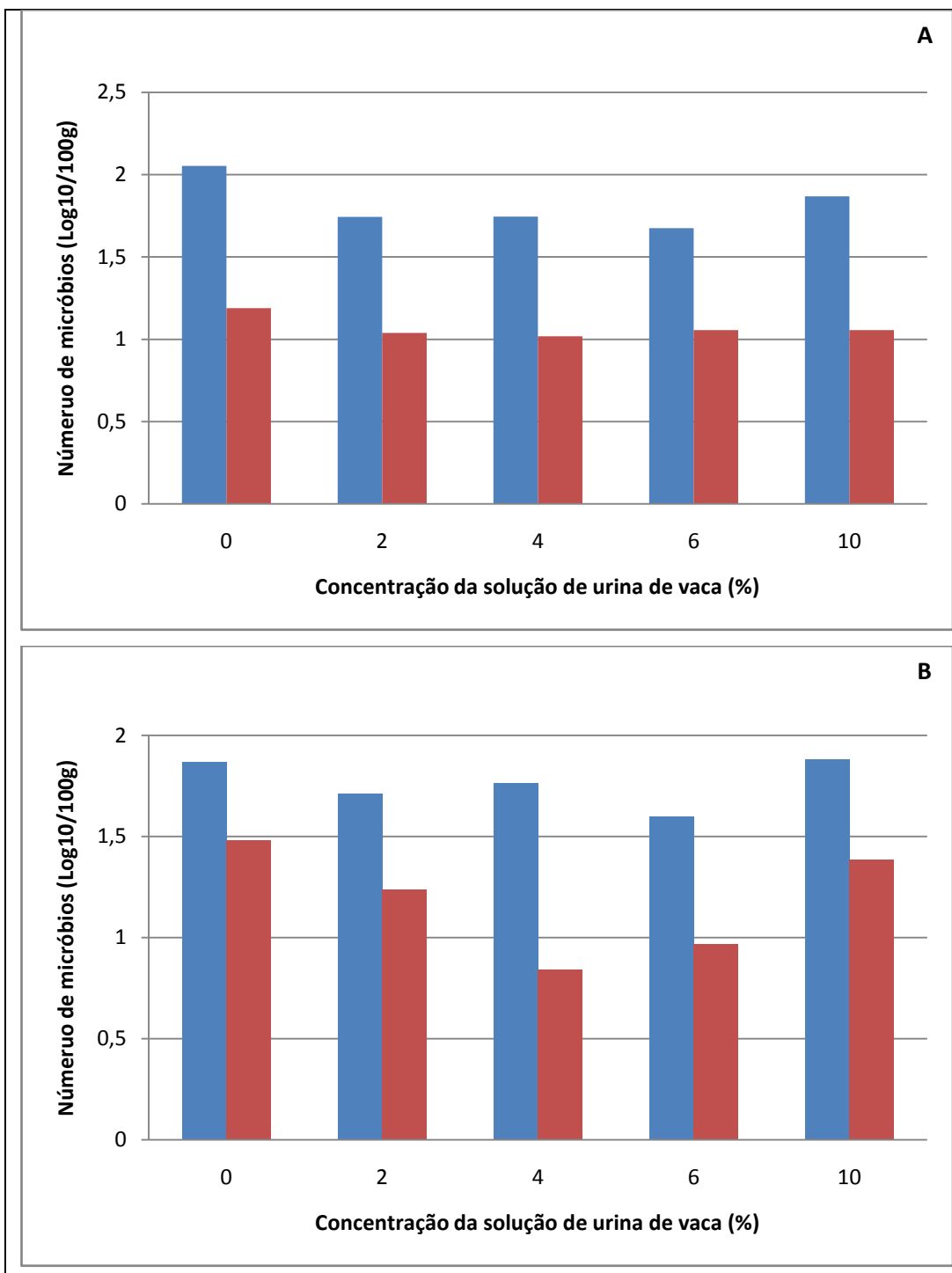


Figura 31. Coliformes termotolerantes (Log₁₀/100g) na alface 'Regina 500' do experimento 3 (A) e na alface 'Babá de Verão' do experimento 4 (B): não lavada (■) e lavada com água pura da ETA/IFMG-SJE (■).

4.8.3. Micro-organismos aeróbios mesófilos em alface lavada apenas em água pura

A lavagem em água pura de folhas de alface dos experimentos 1 e 2, que receberam soluções de urina de vaca via foliar e solo, respectivamente, reduziu a presença de micro-organismos aeróbios mesófilos em todas as amostras, mas nenhuma redução foi significativa em relação às amostras não lavadas (Figura 32A e B).

Verifica-se que, após a lavagem em água pura das alfaces do experimento 1, houve redução de cerca de um ciclo logarítmico para as amostras de todas as concentrações. Entretanto, a contaminação por micro-organismos aeróbios mesófilos em alface lavada continuou muito elevada, entre 10^5 e 10^6 micróbios por g de alface (Figura 32A).

Em relação ao experimento 2, após a lavagem em água pura, houve redução da carga contaminante de cerca de um ciclo logarítmico para as amostras de alface, excetuando-se apenas as amostras que receberam aplicação de solução de urina a 1%. Nessas, a contaminação da alface lavada em água pura, apesar de ter reduzido, manteve-se na ordem de 10^6 microrganismos por grama (Figura 32B).

Mais uma vez, entretanto, os resultados não permitem recomendar a lavagem de folhas da hortaliça apenas em água pura como prática suficiente para a obtenção de alface microbiologicamente segura para a alimentação humana, pois, apesar da redução, todas as amostras lavadas apresentaram-se com taxas de contaminação superiores a 10^5 micro-organismos aeróbios mesófilos por grama (Figura 32A e B).

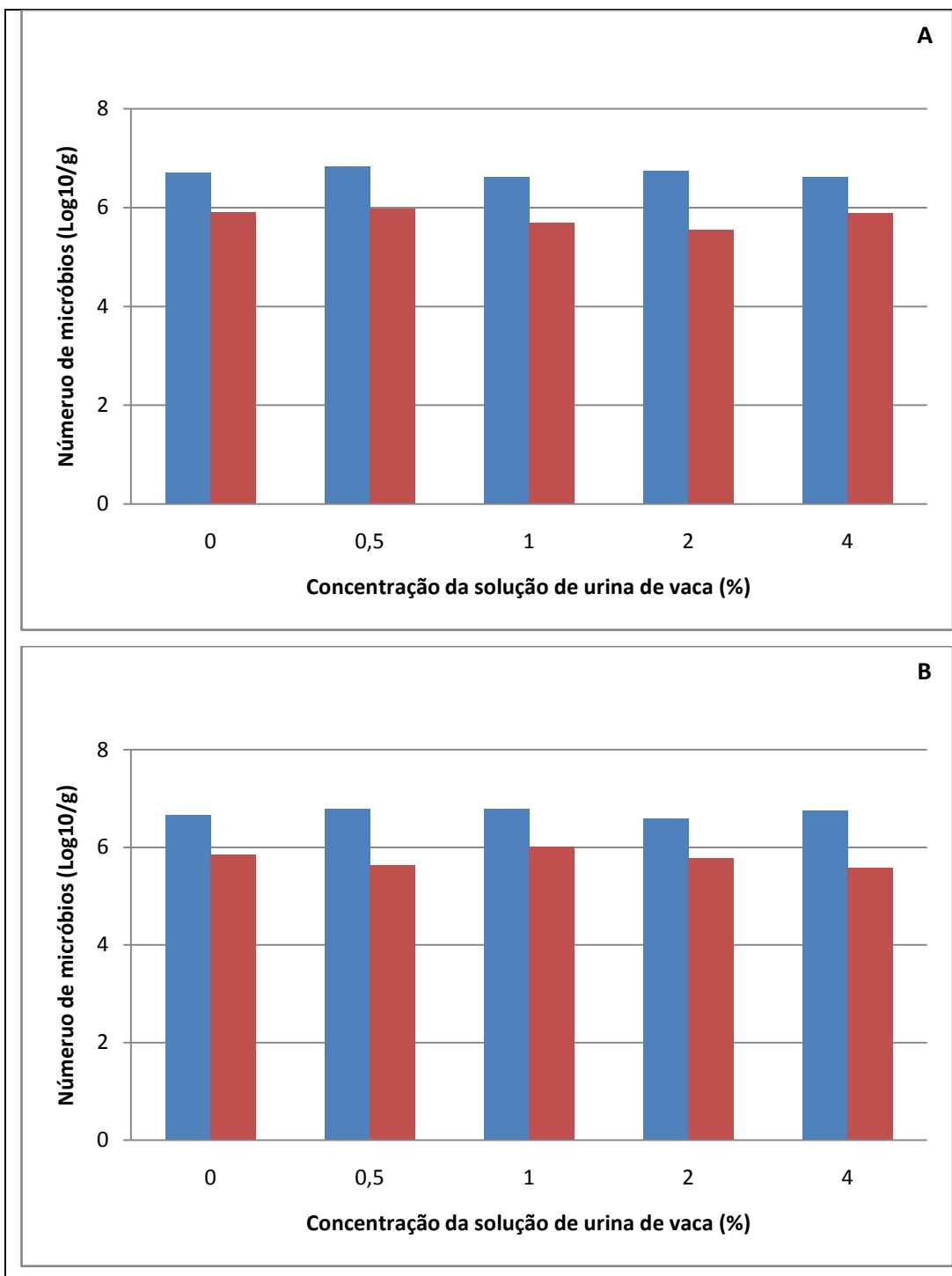


Figura 32. Micro-organismos aeróbios mesófilos (Log₁₀/g) na alface 'Regina 2000' dos experimentos 1 (A) e 2 (B): não lavada (■) e lavada com água pura da ETA/IFMG-SJE (■).

A lavagem das folhas em água pura também reduziu a presença de micro-organismos aeróbios mesófilos em alface dos experimentos 3 e 4,

que receberam soluções de urina de vaca via foliar. Mais uma vez, entretanto, a redução não foi significativa em relação às alfaces não lavadas (Figura 33A e B).

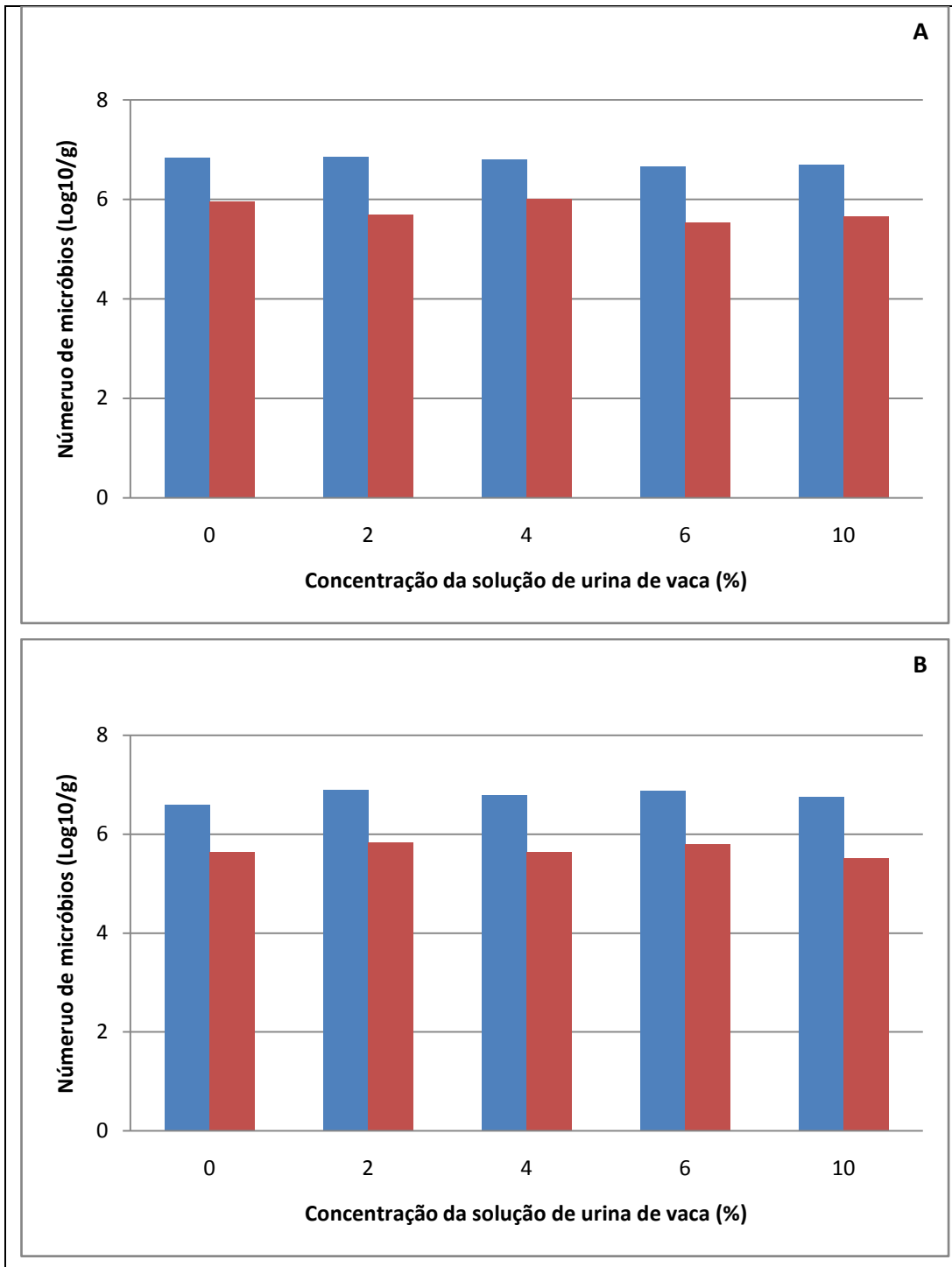


Figura 33. Micro-organismos aeróbios mesófilos (Log₁₀/g) na alface 'Regina 500' do experimento 3 (A) e na alface 'Babá de Verão' do experimento 4 (B): não lavada (■) e lavada com água pura da ETA/IFMG-SJE (■).

É preciso ressaltar também que, embora tenha ocorrido redução de carga microbiana, de um ciclo logarítmico, em todas as amostras de alface lavada nos experimentos 3 e 4 (Figuras 33A e B), todas as amostras conservaram elevadas taxas de contaminação, superiores a 10^5 micro-organismos aeróbios mesófilos por grama.

Esses dados permitem reafirmar a ineficiência da lavagem da alface em água pura tratada com a finalidade de promover sua segurança microbiológica. Portanto, o consumo de alface livre de contaminantes microbianos será possível somente após a sua higienização adequada, efetivada em etapas de limpeza e sanitização.

Na bibliografia há trabalhos que relacionam a qualidade microbiológica da hortaliça cultivada com aplicações de resíduos líquidos de origem animal. O uso desses resíduos líquidos no cultivo de alface causa a transmissão de carga contaminante do resíduo aplicado para a cultura (BISCARO *et al.*, 2008). Esses resíduos promovem a melhoria do desenvolvimento das plantas de alface, mas existe a relação entre a contaminação microbiana dessas hortaliças e a carga microbiana dos resíduos utilizados (BAUMGARTNER *et al.*, 2007). Nesses trabalhos, houve a aplicação dos resíduos contaminados por micróbios em volume de irrigação, o que certamente foi fator decisivo para as altas contagens microbianas verificadas na alface.

BISCARO *et al.* (2008), em cultivo de alface americana irrigada com águas receptoras de efluentes urbanos, verificaram concentrações de coliformes fecais variaram de 1,1 NMP/mL a 9,3 NMP/mL nas amostras de solo dos canteiros e de água de irrigação (receptoras de efluentes urbanos) e de 1,5 NMP/mL a 9,3 NMP/mL nas amostras de alface cultivadas experimentalmente, indicando a transmissão de contaminantes dos efluentes para as culturas.

No trabalho de BAUMGARTNER *et al.* (2007), foi avaliada qualidade sanitária da cultura da alface irrigada com águas residuárias originadas de diversas fontes e foram observadas cargas microbianas de até $9,0 \times 10^4$ NMP/100mL de coliformes totais e de até $5,0 \times 10^4$

NMP/100mL de coliformes fecais. Embora com benefício dos tratamentos para o desenvolvimento da hortaliça, concluíram que em todos os tratamentos ocorreram contaminações por coliformes fecais e totais, e que os tratamentos com as maiores concentrações de micro-organismos produziram as hortaliças mais contaminadas.

No presente trabalho, as análises microbiológicas revelaram que a urina de vaca com maior tempo de armazenamento após a coleta teve menores taxas microbiológicas, o que é um aspecto importante relacionado às aplicações em alface, pois permite a utilização de urina livre de contaminantes.

Outra preocupação refere-se aos procedimentos usados na higienização da alface para a alimentação. A higienização inclui etapas de limpeza e sanitização das superfícies dos alimentos, sendo que lavar em água pura é apenas o início de um procedimento de higienização de alimentos (ANDRADE, 2008). A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies dos alimentos, e a sanitização tem como objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de micro-organismos alteradores para níveis considerados seguros (ANDRADE, 2008).

A limpeza é realizada em etapas de pré-lavagem em água pura, uso de detergentes e enxágue com água pura, e a sanitização pode ser efetuada pelo uso de substâncias químicas como, por exemplo, compostos clorados (ANDRADE, 2008). Portanto, a lavagem de alface em água pura não é considerada sequer como procedimento de limpeza completo, mas apenas o seu primeiro momento. Sendo assim, a lavagem de alface em água pura, está longe de ser considerada como higienização. Esse fato foi verificado no presente trabalho, pois, embora a lavagem tenha contribuído em reduzir a carga microbiana, não foi eficiente em deixar a alface em níveis aceitáveis para alimentação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, além do solo, do substrato das bandejas e do material dos canteiros de cultivo, a água de irrigação pode ser considerada como responsável pela formação de microbiota na superfície das folhas de alface e, também, pode ser considerada como a grande responsável pela sua contaminação microbiológica. Nos quatro experimentos realizados, a água de irrigação pode ter exercido esses dois efeitos sobre a hortaliça.

A urina de vaca, logo após a sua coleta e até a sétima semana de armazenamento em bombona plástica fechada, tem alguma carga microbiana. Na urina de vaca mantida em recipiente fechado, após quatro ou cinco semanas de coleta, ocorre drástica redução de carga microbiana contaminante, que atinge a contagem zero a partir da oitava e nona semanas nesse armazenamento. Essa urina de vaca “envelhecida”, aplicada em alface, em soluções de concentrações de até 5,21%, pode favorecer o desenvolvimento da hortaliça sem contaminá-la microbiologicamente.

As soluções de urina de vaca podem levar micróbios para a superfície de alface. Mas, no caso dos experimentos realizados, a carga microbiana das soluções de urina de vaca foi fortemente definida pela carga microbiana da água utilizada em seu preparo. Desse modo, a influência da urina de vaca na carga contaminante da alface dos experimentos pode ter sido nula ou, no máximo, insignificante. Além disso, em função da pequena dose aplicada (60 mL por planta), dividida em cinco aplicações em intervalos de sete dias, pode ser entendido que a

contribuição de micróbios dada pelas soluções de urina de vaca para a alface foi muito reduzida.

Em relação ao desenvolvimento da alface influenciado, ou não, pela aplicação de soluções de urina de vaca, pode-se afirmar que, em ambas as vias, foliar ou solo, houve melhora no desenvolvimento da hortaliça cultivada em comparação com aquelas pulverizadas com água (concentração 0%). Ressalta-se, contudo, que a via escolhida, foliar ou solo, não promoveu respostas diferenciadas de crescimento quanto às características como MFCA e MFF; mas houve diferenças significativas, entre alguns tratamentos, quanto ao NFP, MFC e CC.

Entre todas as soluções avaliadas nos quatro experimentos, aquelas que promoveram os melhores resultados de aumento, em aplicação foliar, foram: 4,37% para MFCA; 4,38% para NFP; 4,23% para MFF; 5,21% para MFC; e 4,00% para CC. Para as aplicações via solo, os melhores resultados para MFC foram obtidos pela solução a 3,09%, e os melhores resultados para MFCA, NFP, MFF e CC, nas condições avaliadas, foram obtidos pelas soluções com concentrações a 4% de urina de vaca.

As soluções com concentração de urina de vaca entre 4% e 6% promoveram menores taxas de coliformes termotolerantes em alface em relação à testemunha (soluções a 0% de urina de vaca). Entretanto, esses resultados ainda não devem ser tomados como conclusivos antes da realização de novos experimentos. Caso sejam comprovados, fica ainda a necessidade de se explicar qual o mecanismo envolvido nesse possível fenômeno de efeito protetor.

Se os experimentos 1 e 2 com soluções da urina de vaca recém coletada mostraram aumento linear, desde as testemunhas a 0% de urina até as soluções a 4%, nas características de crescimento da hortaliça, os experimentos 3 e 4 revelaram dois aspectos destacáveis: as soluções de urina de vaca armazenadas a mais de 49 dias, com taxas zeradas de micróbios, também promoveram características de crescimento melhores do que as testemunhas (a 0% de urina); com os pontos de máximo nas

soluções entre 4,00% e 5,21%, confirmando-as como as soluções que produziram as melhores características de crescimento para alface nas condições de cultivo aqui apresentadas.

Na alface lavada apenas em água pura houve redução da carga microbiana, mas não o bastante para ficar livre da contaminação. Portanto, o consumo da hortaliça deve ser antecedido de higienização adequada, realizada em todas as etapas de limpeza e sanitização, independentemente da utilização de solução de urina de vaca e da concentração utilizada.

Segundo PARISH *et al.* (2003), o melhor método de eliminação dos micróbios nos alimentos é a prevenção da contaminação. No entanto, como isso nem sempre é possível, a necessidade de lavar e sanitizar os produtos continua a ter primordial importância de modo que se evite surtos de doenças por meio de alimentos.

As contagens de coliformes totais, coliformes termotolerantes e micro-organismos aeróbios mesófilos, não revelaram variação significativa, para mais, nas taxas microbianas das alfaces cultivadas com diferentes soluções de urina de vaca, entre si e em relação às testemunhas. Logo, a contaminação microbiana não foi influenciada de modo significativo por micróbios originários da urina de vaca. Ao que tudo indica, a contaminação microbiana verificada na alface dos quatro experimentos foi gerada pela água de irrigação. Assim, a aplicação de urina de vaca nas condições aqui relatadas beneficiou o crescimento da alface sem colocá-la em risco microbiológico.

Por fim, uma advertência a quem valoriza o bem-estar e a qualidade de vida: a alface, tão amplamente cultivada e consumida pela população do Brasil, pode ser exposta, desde a irrigação até os momentos que antecedem o seu consumo, a contaminação microbiana de tal magnitude que, no consumo fora de casa, deve ser observado atentamente se o estabelecimento que a serve adota padrão higiênico satisfatório. Caso contrário, é mais prudente limitar a sua ingestão no próprio lar.

6. CONCLUSÕES

Soluções de urina de vaca aplicadas via solo na concentração até 4,0% e foliar até 5,21% promovem o crescimento das plantas e a produção da alface;

Soluções de urina de vaca aplicadas via solo, até a concentração de 4%, e via foliar, até 10%, não promovem aumento da carga microbiana em alface. Contudo, recomenda-se a aplicação limitada às concentrações que promovem o crescimento das plantas e a produção da alface;

A urina de vaca pura, hermeticamente fechada em bombona plástica mantida no escuro, apresenta crescimento de coliformes totais, coliformes termotolerantes e micro-organismos aeróbios mesófilos até por volta da 5ª semana, caindo drasticamente, alcançando nível zero, ou próximo desse, após a 7ª semana;

A água de irrigação apresenta elevada carga microbiana e é a maior responsável pela carga microbiana da alface, pois soluções de urina aplicadas via foliar até a concentração de 10% não causaram aumento da carga microbiana da alface;

A simples lavagem das folhas de alface com água pura tratada, apesar de reduzir a carga microbiana, não é eficaz para reduzir essa carga em níveis aceitáveis para os comensais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, T. A. S. de; TAVARES, A. T.; CHAVES, P. P. N.; FERREIRA, T. A.; NASCIMENTO, I. R. do. 2012. **Efeito de intervalos de aplicação de urina bovina na produção de alface em cultivo protegido**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 7, n. 3, Mossoró – RN, p. 53-67.

ANDRADE, N. J. de. 2008. **Higiene na Indústria de Alimentos: Avaliação e Controle da Adesão e Formação de Biofilmes Bacterianos**. Livraria Varela, São Paulo, SP, 412p.

ARBOS, K. A.; FERRARI, F. J.; MARCELLINO, T. G.; CARVALHO, L. A.; FREITAS, R. S. de. 2010. **Avaliação microbiológica de alface e água de irrigação das hortas do Projeto Verde – SESC/MS**. Revista Higiene Alimentar, v. 24, n. 186/187, p.69-74.

BAUMGARTNER, D.; SAMPAIO, S. C.; SILVA, T. R. da; TEO, C. R. P. A.; VILAS BOAS, M. A. 2007. **Reúso de águas residuárias da piscicultura e da suinocultura na irrigação da cultura da alface**. Revista Engenharia Agrícola, v.27, n.1, Jaboticabal, SP, p.152-163.

BISCARO, G. A.; GUIMARÃES-TOMAZELA, A. B.; CRUZ, R. L.; LOPES, M. D. C. 2008. **Aspectos sanitários do cultivo da alface americana, irrigada com águas receptoras de efluentes urbanos**. Revista Ciência e Agrotecnologia, v. 32, n. 1, Lavras, MG, p. 295-301.

BRASIL. 2009. **Manual prático de análise de água**. 3ª ed. rev., Fundação Nacional de Saúde, Brasília, DF, 144 p.

FILGUEIRA, F. A. R. 2003. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2ª edição revista e ampliada, UFV, Viçosa, MG, 412 p.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. 2001. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu, São Paulo, SP, 192p.

GADELHA, R. S. S.; CELESTINO, R. C. A.; SHIMOYA, A. 2003. **Efeito da utilização de urina de vaca na produção da alface**. Pesquisa Agropecuária & Desenvolvimento Sustentável, v.1, n.2, Niterói, RJ, p.179-182.

IBGE. 2013. <http://www.ibge.gov.br>

IFMG-SJE. 2013. <http://www.sje.ifmg.edu.br>

JAY, J. M. 2005. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª edição, Artmed, Porto Alegre, RS, 711p.

LOPES, J. C.; RIBEIRO, L. G.; ARAÚJO, M. G. de; BERALDO, M. R. B. S. 2005. **Produção de alface com doses de lodo de esgoto**. Revista Horticultura Brasileira, v.23, n. 1, Brasília, DF, p. 143-147.

MAISTRO, L. C. 2001. **Alface minimamente processada: uma revisão**. Revista de Nutrição, Campinas, SP, p. 219-224.

MEDEIROS, D. C. de; LIMA, B. A. B. de; BARBOSA, M. R.; ANJOS, R. S. B. dos; BORGES, R. D.; CAVALCANTE NETO, J. G.; MARQUES, L. F. 2007. **Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos**. Revista Horticultura Brasileira, v. 25, n. 3, Brasília, DF, p.433-436.

MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; SILVA, E. C.; CARVALHO, J. G.; YURI, J. E. 2001. **Efeito do cloreto de potássio via fertirrigação na produção de alface Americana em cultivo protegido**. Revista Ciência e Agrotecnologia, vol. 25, p. 542-549.

NELSON, D. L.; COX, M. M. 2011. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. Artmed. Porto Alegre, RS. 1274p.

OLIVEIRA, N. L. C. de. 2007. **Utilização da urina de vaca na produção orgânica de alface**. UFV, Viçosa, MG, 88p.

OLIVEIRA, N. L. C. de; PUIATTI, M.; SANTOS, R. H. S.; CECON, P. R.; BHERING, A. da S. 2010. **Efeito da urina de vaca no estado nutricional da alface**. Revista Ceres, v. 57, n.4, Viçosa, MG, p. 506-515.

OLIVEIRA, N. L. C. de; PUIATTI, M.; BHERING, A. da S.; CECON, P. R.; SILVA, G. do C. C. da. 2012. **USO DE URINA DE VACA NO CULTIVO DA BETERRABA DE MESA**. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v.2, n.2., p.7-13.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRET, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. 2003. **Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce**. Chapter V, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol.2 (Supplement), IFT/FDA Report on Task Order 3, p.161-173.

PESAGRO-RIO. 2002. **Urina de vaca: alternativa eficiente e barata**. 2ª edição, Documentos, 96, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Niterói, RJ, 8p.

RESENDE, F. V.; SAMINÊZ, T. C. O.; VIDAL, M. C.; SOUZA, R. B. de; CLEMENTE, F. M. V. 2007. **Cultivo de Alface em Sistema Orgânico de Produção**. Circular Técnica 56, Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 16 p.

RICCI, M. S. F.; CASALI, V. W. D.; CARDOSO, A. C.; RUIZ, H. 1994. **Produção de alface adubada com composto orgânico**. Revista Horticultura Brasileira, 12, p.56-58.

RIELLA, M. C. 2010. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 5ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 1264p.

ROSA, C. C. B.; MARTINS, M. L. L. 2001. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias das hortaliças de hortas comunitárias de Campos dos Goytacazes – RJ**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, SBM, Londrina, PR, p. 94-104.

RUBATZKY, V. E.; YAMAGUCHI, M. 1997. **World vegetables: principles, production, and nutritive values**. 2nd ed. Chapman & Hall, New York, 843p.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. 2010. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4ª edição, Livraria Varela, São Paulo, SP, 632p.

SOUTO, R. A. de. 2005. **Avaliação sanitária da água de irrigação e de alfaces (*Lactuca sativa* L.) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba**. UFPB, 58p.

TACO. 2011. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – NEPA-UNICAMP**. 4ª edição revista e ampliada, Campinas, SP, 161p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. **Fisiologia Vegetal**. Artmed, Porto Alegre – RS, 719p.

VARALLO, A. C. T.; SOUZA, J. M. de; REZENDE, S. S. R.; SOUZA, C. F. 2011. **Avaliação da qualidade sanitária da alface (*Lactuca sativa*, L.) irrigada com água de reúso comparada com amostras comercializadas**. Revista Ambiente & Água – *An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v. 6, n. 2, p. 295-304.

VILAS BÔAS, R. L.; PASSOS, J. C.; FERNANDES, D. M.; BÜLL, L. T.; CEZAR, V. R. S.; GOTO, R. 2004. **Efeito de doses e tipos de compostos orgânicos na produção de alface em dois solos sob ambiente protegido**. Revista Horticultura Brasileira, v.22, n. 1, Brasília, DF, p. 28-34.

APÊNDICE A

Tabela 1A: Resumo da análise de variância da massa fresca de cabeça de alface (g/planta) dos experimentos 1 e 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	1.044,5544	130,5693	
Tratamento (T)	4	10.847,1612	2.711,7903	289,22**
Experimento (E)	1	365,5808	365,5808	38,99**
T x E	4	37,5052	9,3763	0,45 ^{ns}
Erro Médio	32	659,5536	20,6110	
Total	49	12.954,3552		
Média		112,44		
CV (%)		4,04		

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 2A: Resumo da análise de variância do número de folhas por planta de alface dos experimentos 1 e 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	107,236	13,4045	
Tratamento (T)	4	680,0092	170,0023	12,81*
Experimento (E)	1	1,2482	1,2482	0,09 ^{ns}
T x E	4	53,0788	13,2697	6,48**
Erro Médio	32	65,48	2,0463	
Total	49	907,0522		
Média		35,13		
CV (%)		4,07		

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 3A: Resumo da análise de variância da massa fresca de folha de alface (g/planta) dos experimentos 1 e 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	872,66	109,0825	
Tratamento (T)	4	9.200,3648	2.300,0912	431,88**
Experimento (E)	1	209,3058	209,3058	39,30**
T x E	4	21,3032	5,3258	0,31 ^{ns}
Erro Médio	32	542,104	16,9408	
Total	49	10.845,7378		
Média	102,26			
CV (%)	4,02			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 4A: Resumo da análise de variância da massa fresca de caule de alface (g/planta) dos experimentos 1 e 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	8,2536	1,0317	
Tratamento (T)	4	77,9668	19,4917	6,45*
Experimento (E)	1	22,3112	22,3112	7,38 ^{ns}
T x E	4	12,0908	3,0227	14,14**
Erro Médio	32	6,8384	0,2137	
Total	49	127,4608		
Média	10,17			
CV (%)	4,54			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 5A: Resumo da análise de variância do comprimento de caule de alface (cm/planta) dos experimentos 1 e 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	20,3088	2,5386	
Tratamento (T)	4	38,786	9,6965	21,47**
Experimento (E)	1	0,8192	0,8192	1,81 ^{ns}
T x E	4	1,8068	0,4517	3,80*
Erro Médio	32	3,7992	0,1187	
Total	49	65,52		
Média	6,32			
CV (%)	5,45			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 6A: Resumo da análise de variância dos coliformes termotolerantes de alface (Log₁₀/100g) dos experimentos 1 e 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	2,2419	0,2802	
Tratamento (T)	4	1,0113	0,2528	1,32 ^{ns}
Experimento (E)	1	0,1475	0,1475	0,77 ^{ns}
T x E	4	0,7688	0,1922	0,41 ^{ns}
Erro Médio	32	14,8875	0,4652	
Total	49	19,057		
Média	1,86			
CV (%)	36,75			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 7A: Resumo da análise de variância dos micro-organismos aeróbios mesófilos de alface (Log10/g) dos experimentos 1 e 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	0,1687	0,0211	
Tratamento (T)	4	0,1337	0,0334	0,78 ^{ns}
Experimento (E)	1	0,0018	0,0018	0,04 ^{ns}
T x E	4	0,1720	0,0430	0,52 ^{ns}
Erro Médio	32	2,6424	0,0826	
Total	49	3,1186		
Média	6,71			
CV (%)	4,28			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 8A: Resumo da análise de variância dos coliformes termotolerantes de alface (Log10/100g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 1.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	2,2794	0,2849	
Tratamento (T)	4	0,7542	0,1886	3,85 ^{ns}
Experimento (E)	1	3,3744	3,3744	68,9 ^{**}
T x E	4	0,1959	0,0490	0,12 ^{ns}
Erro Médio	32	12,7727	0,3991	
Total	49	19,3766		
Média	1,54			
CV (%)	40,98			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 9A: Resumo da análise de variância dos coliformes termotolerantes de alface (Log10/100g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	0,8428	0,1053	
Tratamento (T)	4	3,3282	0,8320	29,11**
Experimento (E)	1	4,5200	4,5200	158,15**
T x E	4	0,1143	0,0286	0,10 ^{ns}
Erro Médio	32	9,5324	0,2979	
Total	49	18,3377		
Média	1,61			
CV (%)	33,9			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 10A: Resumo da análise de variância dos coliformes termotolerantes de alface (Log10/100g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 3.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	6	4,7889	0,7981	
Tratamento (T)	4	0,3575	0,0894	4,96 ^{ns}
Experimento (E)	1	5,5644	5,5644	308,49**
T x E	4	0,0722	0,0180	0,11 ^{ns}
Erro Médio	24	3,8172	0,1591	
Total	39	14,6002		
Média	1,44			
CV (%)	27,6			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 11A: Resumo da análise de variância dos coliformes termotolerantes de alface (Log10/100g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 4.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	6	0,3623	0,0604	
Tratamento (T)	4	1,0538	0,2634	3,03 ^{ns}
Experimento (E)	1	3,3867	3,3867	38,96 ^{**}
T x E	4	0,3477	0,0869	0,24 ^{ns}
Erro Médio	24	8,6073	0,3586	
Total	39	13,7578		
Média	1,47			
CV (%)	40,6			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 12A: Resumo da análise de variância dos micro-organismos aeróbios mesófilos de alface (Log10/g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 1.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	1,4538	0,1817	
Tratamento (T)	4	0,4846	0,1211	1,56 ^{ns}
Experimento (E)	1	10,1973	10,1974	131,7 ^{**}
T x E	4	0,3097	0,0774	0,44 ^{ns}
Erro Médio	32	5,6403	0,1763	
Total	49	18,0857		
Média	6,25			
CV (%)	6,7			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 13A: Resumo da análise de variância dos micro-organismos aeróbios mesófilos de alface (Log10/g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 2.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	8	1,2800	0,1600	
Tratamento (T)	4	0,3332	0,0833	0,80 ^{ns}
Experimento (E)	1	11,2580	11,2580	108,6 ^{**}
T x E	4	0,4145	0,1036	0,83 ^{ns}
Erro Médio	32	3,9987	0,1250	
Total	49	17,2844		
Média	6,24			
CV (%)	5,66			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 14A: Resumo da análise de variância dos micro-organismos aeróbios mesófilos de alface (Log10/g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 3.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	6	0,4148	0,0691	
Tratamento (T)	4	0,5740	0,1435	2,90 ^{ns}
Experimento (E)	1	9,9910	9,9910	201,7 ^{**}
T x E	4	0,1981	0,0495	0,46 ^{ns}
Erro Médio	24	2,5737	0,1072	
Total	39	13,7516		
Média	6,27			
CV (%)	5,2			

** : F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; * : F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} : F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 15A: Resumo da análise de variância dos micro-organismos aeróbios mesófilos de alface (Log10/g), não lavada e lavada em água pura da ETA/IFMG-SJE, do experimento 4.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos/Experimento	6	0,5573	0,0929	
Tratamento (T)	4	0,4123	0,1031	4,33 ^{ns}
Experimento (E)	1	12,0868	12,0868	507,9 ^{**}
T x E	4	0,0952	0,0238	0,58 ^{ns}
Erro Médio	24	0,9874	0,0411	
Total	39	14,139		
Média	6,23			
CV (%)	3,25			

^{**}: F significativo a 1% e a 5% de probabilidade; ^{*}: F significativo a 5% de probabilidade; ^{ns}: F não-significativo a 5% de probabilidade.