

ROBERTA TORRES CARELI

**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. NA CADEIA PRODUTIVA
DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.), SUA CAPTURA E RETENÇÃO POR
BIOFILMES DE *Pseudomonas fluorescens* E SEU CONTROLE
POR SURFACTANTES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

T

C271o
2009

Careli, Roberta Torres, 1975-

Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de alface (*Lactuca sativa* L.) sua captura e retenção por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* e seu controle por surfactantes / Roberta Torres Careli – Viçosa, MG, 2009. xxi, 154f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alface - Análise. 2. *Cryptosporidium*. 3. *Giardia*.
4. Biofilmes. 5. Surfactantes. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.80552

ROBERTA TORRES CARELI


**OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. NA CADEIA PRODUTIVA
DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.), SUA CAPTURA E RETENÇÃO POR
BIOFILMES DE *Pseudomonas fluorescens* E SEU CONTROLE
POR SURFACTANTES**

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

APROVADA: 29 de outubro de 2009.



Prof. Luís Antônio Minim
(Coorientador)




Drª Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto



Dr. Maurílio Lopes Martins



Dr. Washington Azevedo da Silva



Prof. Nélcio José de Andrade
(Orientador)

“Vós, investigadores, não deveis confiar em autores que, apenas pelo emprego da imaginação, se fazem intérpretes entre a natureza e o homem, mas somente naqueles que exercitaram seu intelecto com os resultados de experimentos.”

Leonardo da Vinci

A Deus,
que, com seu amor incondicional,
sempre me proporcionou uma vida
de alegrias e conquistas,
Ofereço.

A meus pais, João Bosco e Miriam,
a quem amo muito e sem eles nada na
minha vida seria possível,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, com seu amor de Pai, cuida de mim em todos os momentos da minha vida.

À Nossa Senhora das Graças que sempre intercede por mim nas horas mais difíceis mostrando o caminho a ser percorrido.

Aos meus queridos pais, João Bosco e Miriam, por estarem sempre presentes, pois sem o apoio e a confiança que depositaram em mim, teria sido mais difícil chegar até aqui.

Aos meus queridos irmãos, Renata e Rodrigo, que, apesar da distância, sempre torceram por mim e, acima de tudo, me apoiam.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado e pelo aprendizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Nélio José de Andrade, pela orientação, amizade, confiança, pelos ensinamentos e por todo apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. José Ivo Ribeiro Júnior, pela coorientação, ajuda valiosa nas análises estatísticas e pelos ensinamentos.

À Prof^a Paula Dias Bevilacqua, pela coorientação e ajuda na disponibilização de materiais e equipamentos essenciais para realização desse trabalho.

Ao Prof. Luís Antônio Minim, pelas sugestões e por disponibilizar o uso de equipamentos de seu laboratório sempre que necessário.

À Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pesquisadora da Epamig, pelas sugestões participação na banca de defesa.

Ao Dr. Maurílio Lopes Martins, pelas sugestões e participação na banca de defesa.

Ao Dr. Washington Azevedo da Silva, pelas sugestões e participação na banca de defesa.

Ao Prof. Sukarno Olavo Ferreira, pela ajuda na realização das análises de Microscopia de Força Atômica.

À Dr^a Cláudia Alencar Vanetti, técnica do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela ajuda, pelos ensinamentos sobre as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos proprietários das unidades produtoras de alface, por permitirem a realização das coletas.

À Júnia, minha companheira “desbravadora das hortas”, pela amizade e por não medir esforços, não se importando com dia nem hora para a realização de coletas e análises.

Aos estagiários: Caio Pacheco, Daniele Colombari e Daniela Leocádio, pela participação valiosa na realização desse trabalho.

À Grazielle Menezes Ferreira Dias, pelos esclarecimentos no início dos experimentos.

À Cida Antunes, por ter disponibilizado os primeiros *kits* para realização do início do trabalho.

Ao meu namorado Thiago, pelo apoio, ajuda, amor e companheirismo.

A todos os colegas do Laboratório de Higiene Industrial/DTA pela convivência e colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente José Tomaz (Perereca), Lúcia, Pio, Geralda, Vaninha, Juarez e Sr. Manoel.

Às amigas Fabiana Rodrigues, Priscilla Lima, Bruna Mara, Geruza Dias e Iara Dias pelo apoio, companheirismo e incentivo sempre presentes no decorrer dessa trajetória.

À querida amiga Eliana Figueiredo, minha mãe em Viçosa, pela amizade, ajuda e por todos os conselhos.

Enfim, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos que me apoiaram, encorajaram, ajudaram e contribuíram para a conclusão dessa etapa importante de minha vida.

BIOGRAFIA

ROBERTA TORRES CARELI, filha de João Bosco Careli e Miriam Carvalho Torres Careli, nasceu em São Paulo, Estado de São Paulo, em 17 de novembro de 1975.

Em maio de 2002, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade de Viçosa.

Em agosto de 2003 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou o Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, defendendo tese em outubro de 2009.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1. Fatores que contribuem para ocorrência de doenças de origem alimentar	3
1.2. Microrganismos patogênicos associados com produtos frescos	5
1.3. Considerações e aspectos sanitários do cultivo de hortaliças	5
1.4. Possíveis fontes de contaminação microbiológica e parasitológica no meio rural	6
1.4.1. Água.....	6
1.4.2. Insumos naturais.....	9
1.4.3. Hábitos de higiene inadequados	10
1.5. Enteroparasitas causadores de infecções alimentares	10
1.5.1. Criptosporidiose	12
1.5.2. Giardiose.....	16
1.5.3. Fatores que afetam a sobrevivência de (oo)cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	19
1.6. Correlação entre parâmetros de qualidade da água e presença de (oo)cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	21

1.7. Interações entre biofilmes bacterianos e oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	23
1.7.1. Adesão bacteriana e formação de biofilmes	25
1.7.1.1. Fatores físico-químicos que afetam a formação de biofilmes	26
1.7.2. Estratégias de controle da adesão e formação de biofilmes	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 2	48
<i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.: OCORRÊNCIA EM ALFACE, SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS DE QUALIDADE DE PRODUÇÃO E CONTROLE POR PROCEDIMENTOS DE HIGIENIZAÇÃO.....	48
1. INTRODUÇÃO	48
2. OBJETIVOS	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1. Parâmetros de qualidade na produção de alface	52
3.2. Análises realizadas em água de irrigação.....	52
3.2.1. Quantificação de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.	53
3.2.1.1. Visualização e quantificação de (oo)cistos	54
3.2.2. Quantificação de esporos anaeróbios e <i>Clostridium perfringens</i>	55
3.2.3. Quantificação de esporos aeróbios e <i>Bacillus</i> spp.	56
3.2.4. Quantificação de coliformes a 35 °C e <i>Escherichia coli</i>	56
3.2.5. Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp.	56
3.2.6. Determinação da turbidez.....	57
3.3. Análises realizadas em alface.....	57
3.3.1. Quantificação de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	57
3.3.1.1. Concentração das amostras.....	57
3.3.2. Quantificação de esporos anaeróbios e <i>Clostridium perfringens</i>	58
3.3.3. Quantificação de esporos aeróbios e <i>Bacillus</i> spp.....	59
3.3.4. Quantificação de coliformes a 35 °C e <i>Escherichia coli</i>	60
3.3.5. Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp.....	60
3.4. Análises realizadas em adubo orgânico.....	60
3.4.1. Quantificação de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.	60
3.4.1.1. Concentração das amostras	60
3.4.2. Quantificação de esporos anaeróbios e <i>Clostridium perfringens</i>	61
3.4.3. Quantificação de esporos aeróbios e <i>Bacillus</i> spp.....	62

3.4.4. Quantificação de coliformes a 35°C e <i>Escherichia coli</i>	62
3.4.5. Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp.	62
3.5. Análises realizadas em solo.....	62
3.5.1. Quantificação de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.	62
3.5.1.1. Concentração das amostras.....	62
3.5.2. Quantificação de esporos anaeróbios e <i>Clostridium perfringens</i>	63
3.5.3. Quantificação de esporos aeróbios e <i>Bacillus</i> spp.	63
3.5.4. Quantificação de coliformes a 35 °C e <i>Escherichia coli</i>	64
3.5.5. Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp.	64
3.6. Teste do desafio microbiológico.....	64
3.6.1. Microrganismos utilizados	64
3.6.2. Preparo da suspensão de microrganismos	64
3.6.3. Preparo da alface para contaminação intencional	65
3.6.4. Teste da exclusão microbiológica	65
3.6.5. Contaminação intencional da folha de alface	66
3.6.6. Preparo das soluções surfactantes	66
3.6.7. Ação dos surfactantes sobre os microrganismos aderidos	68
3.6.8. Recuperação de microrganismos após aplicação dos surfactantes.....	68
3.7. Análise dos resultados.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em hortas de alface.....	72
4.2. Avaliação de diferentes parâmetros de qualidade na produção alface	82
4.2.1. Turbidez da água usada para irrigação.....	82
4.2.2. Parâmetros microbiológicos de qualidade na produção de alface	85
4.3. Correlação entre a ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp., diferentes parâmetros bacteriológicos e turbidez	90
4.4. Teste do desafio microbiológico.....	92
5. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
CAPÍTULO 3	109
Captura e retenção de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> por biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em tubulação de PVC utilizada em irrigação de hortaliças folhosas.....	109
1. INTRODUÇÃO	109

2. OBJETIVOS	111
2.1. Objetivo geral	111
2.1. Objetivos específicos	111
3. MATERIAL E MÉTODOS	112
3.1. Microrganismo e preparo da suspensão bacteriana	112
3.2. Higienização de tubulação de Poli (cloreto de vinila), tampas rosqueáveis e mangueiras.....	113
3.3. Montagem do sistema para formação de biofilmes	113
3.4. Inoculação de <i>Cryptosporidium parvum</i>	115
3.5. Quantificação do biofilme de <i>P. fluorescens</i> e de oocistos de <i>C. parvum</i> capturados e retidos	115
3.6. Caracterização topográfica da superfície da tubulação de poli (cloreto de vinila).....	119
3.7. Microscopia eletrônica de varredura	119
3.7.1. Preparo das amostras.....	119
3.7.2. Desidratação das amostras e metalização com ouro.....	120
3.8. Hidrofobicidade qualitativa, energia livre de superfície e energia livre de adesão	120
3.8.1. Preparo das células de <i>P. fluorescens</i> e dos oocistos de <i>C. parvum</i> para a medição de ângulos de contato	121
3.8.2. Preparo das superfícies de tubulação de poli (cloreto de vinila) para a medição de ângulos de contato	121
3.8.3. Ângulos de contato e avaliação qualitativa da hidrofobicidade das superfícies	122
3.8.4. Determinação da energia livre de superfície	123
3.8.5. Determinação da energia livre total de adesão.....	125
3.9. Controle de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> e de oocistos de <i>C. parvum</i> aderidos em tubulação de PVC pelo surfactante cloreto de benzalcônio.....	126
3.9.1. Formação de biofilmes de <i>P. fluorescens</i>	126
3.9.2. Inoculação de <i>C. parvum</i>	127
3.9.3. Aplicação do surfactante.....	127
3.9.4. Recuperação de células de <i>P. fluorescens</i> e de oocistos de <i>C. parvum</i> após aplicação do surfactante	130
3.9.5. Visualização dos microrganismos	130

3.10. Análise dos resultados	131
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
4.1. Formação de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> na tubulação de PVC utilizada na irrigação de hortaliças	132
4.2. Captura e retenção de oocistos de <i>C. parvum</i> por biofilmes de <i>P. fluorescens</i> e adesão de oocistos de <i>C. parvum</i> em tubulação de PVC	135
4.3. Avaliação topográfica da superfície de PVC por microscopia de força atômica	138
4.4. Influência da hidrofobicidade na formação de biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> e dos oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> aderidos em tubulação de PVC	139
4.5. Avaliação da Energia Livre de Adesão	142
4.6. Controle de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> e de oocistos de <i>C. parvum</i> aderidos em tubulação de PVC pelo surfactante cloreto de benzalcônio.....	143
5. CONCLUSÃO.....	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- 1 Tipos de surfactantes e concentrações utilizadas para avaliação da remoção de *C. parvum* e *P. fluorescens*, aderidos a 25 °C por 12 h, em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão.....67
- 2 Estimativas das equações de regressão da contaminação microbiológica de alface em função da contaminação da água de irrigação utilizada nas unidades produtoras..... 79
- 3 Estimativas das equações de regressão da contaminação bacteriológica de alface em função das contaminações da água de irrigação, do adubo orgânico e do solo utilizados nas diferentes unidades produtoras de alface 87
- 4 Estimativas das equações de regressão da contaminação bacteriológica do solo em função das contaminações da água de irrigação e do adubo orgânico utilizados nas diferentes unidades produtoras de alface 87
- 5 Médias do número total de microrganismos em água de irrigação, expressas em log UFC.100 mL⁻¹, avaliados em diferentes unidades produtoras (UP) de alface nos períodos de seca e águas 89
- 6 Resultados das análises de correlação, pelo teste de *Pearson*, entre *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., parâmetros microbiológicos e turbidez avaliados em água de irrigação, alface, adubo, solo proveniente de diferentes unidades produtoras..... 90
- 7 Médias gerais do número de reduções decimais da população de oocistos de *C. parvum*, expresso em log oocistos.cm⁻², e da população de células de *P. fluorescens*, expresso em log UFC.cm⁻², aderidos em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão, após a aplicação dos surfactantes Cloreto de Benzalcônio, Tween 80 e Dodecil sulfato de sódio 93
- 8 Médias da população de oocistos de *C. parvum* em cultura pura e mista, expressas em log oocistos.cm⁻² e da população de células de *P. fluorescens* em cultura mista, expressas em log UFC.cm⁻², aderidos por 12 h em água peptonada 0,1% a 25 °C, em cupons de alface cultivar Vitória de Santo Antão, sem tratamento com surfactante 94

CAPÍTULO 3

1	Valores das componentes da tensão superficial dos líquidos a 20 °C.....	124
2	Parâmetros de rugosidade da superfície da tubulação de PVC utilizada para irrigação de hortaliças folhosas medidos por microscopia de força atômica.....	138
3	Valores médios dos ângulos de contato (θ) determinados à temperatura ambiente sobre as superfícies da tubulação de PVC, de <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525, de oocistos de <i>C. parvum</i> e dos dois microrganismos em cultura mista com água (θ_W), formamida (θ_F) e α -bromonaftaleno(θ_B).....	140
4	Valores das componentes de tensão superficial (γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^-) e grau de hidrofobicidade (ΔG_{sWS}) das superfícies da tubulação de PVC, de <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525, de oocistos de <i>C. parvum</i> e dos dois microrganismos em cultura mista.....	141
5	Valores da energia livre total de adesão entre a superfície de PVC (1) e <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 e, ou <i>C. parvum</i> (2).....	143

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- 1 Ângulo de contato (θ) entre uma gota de líquido e uma superfície plana e horizontal. As tensões superficiais da superfície do sólido γ_S , do líquido em equilíbrio com o vapor γ_{LV} e superfície/líquido γ_{SL} (van LOOSDRECHT et al., 1987)..... 29
- 2 Representação esquemática da interação do surfactante com a água. 31

CAPÍTULO 2

- 1 Caracterização parasitológica de água de irrigação de fontes de abastecimento em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições..... 73
- 2 Unidades produtoras de alface de acordo com suas respectivas fontes de água para irrigação: (1) poço semi-artesiano; (2) mina; (3) nascente; (4) córrego e (5) poço artesiano 75
- 3 Reservatório utilizado para armazenagem de água proveniente de dois poços semi-artesianos antes do bombeamento para irrigação das hortaliças da unidade produtora 1. 76
- 4 Reservatórios utilizados para armazenagem de água proveniente de mina antes do bombeamento para irrigação das hortaliças da unidade produtora 2. 76
- 5 Caracterização parasitológica de alface produzida em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições..... 77
- 6 Acesso de animais às hortas que podem ser fontes de contaminação desses ambientes 78
- 7 Caracterização parasitológica de adubo orgânico produzido em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições..... 80
- 8 Compostagem de adubo orgânico em unidades produtoras de alface situadas na região de Viçosa - MG 80

9	Caracterização parasitológica de solo presente em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições.....	81
10	Valores médios de turbidez da água utilizada na irrigação de alface, expressos em Unidades Nefelométricas de Turbidez (UNT) e medidas de pluviosidade média da semana de coleta, expressas em mm, segundo a unidade produtora (UP), avaliadas nos períodos de seca (maio a setembro) e águas (outubro a fevereiro).....	82
11	Turbidez da água do córrego, pertencente à unidade produtora 4, durante os períodos de seca (a) e águas (b).....	83
12	Qualidade bacteriológica de amostras de água, alface, adubo orgânico e solo coletadas nas diferentes unidades produtoras (UP) de alface em períodos de seca e águas.....	86
13	Redução decimal (RD) de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> , expresso em log oocistos.cm ⁻² , em culturas pura e mista com <i>Pseudomonas fluorescens</i> , aderidos em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão, após tratamentos por 10 min de contato com diferentes concentrações de Cloreto de Benzalcônio (CB), Tween 80 (TWE) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05).....	96
14	Redução decimal (RD) de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , expresso em log UFC.cm ⁻² , aderidas em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão, após tratamentos por 10 min de contato com diferentes concentrações de Cloreto de Benzalcônio (CB), Tween 80 (TWE) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05).....	97

CAPÍTULO 3

1	Composição dos reatores utilizados no experimento: (a) tubulação de poli (cloreto de vinila); (b) tampas rosqueáveis furadas; (c) tampas rosqueáveis sem furo; (d) mangueiras de silicone.....	114
2	Sistema experimental para formação do biofilme de <i>P. fluorescens</i> em meio mínimo de sais, por cinco dias consecutivos a 25 °C.....	114
3	Composição do utensílio usado para retirada do biofilme de <i>P. fluorescens</i> e dos oocistos de <i>C. parvum</i> capturados e, ou retidos na tubulação de PVC. (a) Haste de aço inoxidável com disco de neopreno em uma das extremidades e (b) orifícios do disco de neopreno (setas) para passagem da solução de eluição.....	116
4	Demonstração da etapa de retirada do biofilme de <i>P. fluorescens</i> e dos oocistos de <i>C. parvum</i> capturados e, ou retidos na tubulação de PVC. (a) Entrada da haste na tubulação e (b) Haste empurrada até o fundo da tubulação por seis vezes em movimentos de cima para baixo.....	116
5	Cupom de PVC, com dimensões de 2 cm x 2 cm, sobre o suporte do aparelho e aplicação da gota de um dos líquidos utilizados para medição do ângulo de contato.....	122
6	Medição dos ângulos de contato na superfície de PVC: (a) Goniômetro e (b) Sistema de análise de imagem do aparelho.....	123
7	Reator de PVC fechado com as tampas sem furo.....	128
8	Movimentos rotatórios nos sentidos: (a) longitudinal para cima, (b) longitudinal para baixo, (c) lateral para a esquerda, (d) lateral para a direita e (e) tipo baliza.....	129
9	Concentrações médias de <i>P. fluorescens</i> em biofilme formado por seis dias a 25 °C, em tubulação de poli (cloreto de vinila) utilizada na irrigação de hortaliças.....	133

10	Biofilmes de <i>P. fluorescens</i> em superfícies de tubulações de poli (cloreto de vinila) utilizadas na irrigação de hortaliças, observadas por microscopia eletrônica de varredura: (a) presença de exopolissacarídeos (seta) e (b) biofilme maduro	133
11	Concentrações médias de <i>P. fluorescens</i> em suspensão no Meio Mínimo de Sais, inoculadas a 25 °C, no início e ao final de cada dia de formação do biofilme na tubulação de poli (cloreto de vinila).....	134
12	Oocistos de <i>C. parvum</i> capturados ou retidos com e sem a formação de biofilme de <i>P. fluorescens</i> em tubulação de PVC utilizada na irrigação de hortaliças	136
13	Oocistos de <i>C. parvum</i> : (a) e (b) capturados ou (c) e (d) retidos por biofilmes de <i>P. fluorescens</i> em tubulação de PVC utilizada na irrigação de hortaliças, avaliados por microscopia eletrônica de varredura.....	137
14	Microtopografias da superfície da tubulação de poli (cloreto de vinila) utilizada na irrigação de hortaliças folhosas, em planos (a) bidimensional e (b) tridimensional, realizadas por microscopia de força atômica	139
15	Redução decimal de oocistos de <i>C. parvum</i> , e de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> , expressos em log oocistos.cm ⁻² e log UFC.cm ⁻² , respectivamente, aderidos em tubulação de PVC a 25 °C após tratamentos com dez concentrações de Cloreto de Benzalcônio durante 10 min de contato. *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05).....	144
16	Células de <i>P. fluorescens</i> em biofilme e oocistos de <i>C. parvum</i> aderidos em tubulação de PVC utilizada para irrigação de hortaliças, avaliados por microscopia de força atômica, antes e após o tratamento com diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio: (a) Controle; (b) 1200 mg.L ⁻¹ (c) 1800 mg.L ⁻¹ ;(d) 2200 mg.L ⁻¹ ;(e) 2600 mg.L ⁻¹ ;(f) 2800 mg.L ⁻¹	146

RESUMO

CARELI, Roberta Torres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2009.
Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de alface (*Lactuca sativa* L.), sua captura e retenção por biofilme de *Pseudomonas fluorescens* e seu controle por surfactantes. Orientador: Nélcio José de Andrade.
Coorientadores: Paula Dias Bevilacqua, José Ivo Ribeiro Júnior e Luís Antônio Minim.

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em unidades produtoras de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão, situadas na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, foi avaliada nos períodos de seca e de águas. Constatou-se a presença de ambos os protozoários em água, alface, adubo orgânico e solo em, pelo menos, uma unidade produtora de alface e um período. A principal fonte de contaminação de ambos os protozoários em alface foi a água usada para irrigação e os números desses microrganismos tiveram influência das variações pluviométricas ($p < 0,05$), sendo mais elevados no período de águas. A contaminação microbiológica de água, alface, adubo orgânico e solo também foi mostrada por diferentes análises bacteriológicas. Foram observadas correlações elevadas entre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em todos os tipos de amostras, com exceção do adubo. Em água também foram constatadas boas correlações entre protozoários e *C. perfringens*. Os resultados indicaram que alguns indicadores bacteriológicos, como o grupo coliforme, não são preditivos para a presença de protozoários. Além disso, os valores de turbidez das diferentes fontes de água pertencentes às unidades produtoras apresentaram-se mais elevados durante a época de águas e apresentaram correlação alta com a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água de irrigação. A capacidade de remoção

de *Cryptosporidium parvum* em cultura pura ou mista com *Pseudomonas fluorescens* aderidos por 12 h em cupons de folhas de alface foi avaliada pela utilização de soluções com diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio, Tween 80 e dodecil sulfato de sódio (SDS) por 10 min de contato. Constatou-se que SDS apresentou uma maior remoção dos protozoários e sua efetividade aumentou com a concentração ($p < 0,05$). Avaliou-se a capacidade de oocistos de *C. parvum* serem capturados e retidos por biofilmes de *P. fluorescens* formados em tubulação de poli (cloreto de vinila), PVC. O número de oocistos capturados pelo biofilme foi maior ($p < 0,05$) do que o de oocistos retidos após o aumento de seis vezes do fluxo do líquido circulante. Constatou-se que, na ausência do biofilme bacteriano, os oocistos possuem pouca capacidade de adesão à superfície de PVC. Os aspectos termodinâmicos na formação de biofilmes de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum* aderidos à tubulação de PVC também foram avaliados. Observou-se que as superfícies de *C. parvum* e *P. fluorescens* apresentaram caráter hidrofílico, ao contrário do PVC que é hidrofóbico. Esses resultados foram confirmados pela quantificação da energia livre de superfície (ΔG_{sws}). A quantificação da energia livre total de interação indicou que a adesão de *P. fluorescens* na forma de biofilmes e de oocistos de *C. parvum* foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{\text{adesão}}^{\text{TOT}} < 0$) em todas as condições. O controle de biofilmes de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum* aderidos em tubulação de PVC foi realizado por meio de aplicação de cloreto de benzalcônio. As concentrações testadas das soluções de cloreto de benzalcônio resultaram em aumento ($P < 0,05$) no número de RD de ambos os microrganismos à medida que os mesmos foram submetidos a tratamentos com soluções surfactantes em concentrações mais elevadas. A aplicação de soluções de cloreto de benzalcônio em procedimentos de higienização pode ser uma alternativa de controle de bactérias e protozoários aderidos à tubulação de PVC utilizada na irrigação de hortaliças. Contudo, são necessários testes toxicológicos para avaliar o efeito nocivo desse produto na concentração sugerida.

ABSTRACT

CARELI, Roberta Torres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2009. **Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in the chain production of lettuce (*Lactuca sativa* L.), its capture and retention by *Pseudomonas fluorescens* biofilm and its control by surfactants.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: Paula Dias Bevilacqua, José Ivo Ribeiro Júnior and Luís Antônio Minim.

The occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp was evaluated on plantations of oily lettuce, variety Vitoria de Santo Antão, on the countryside of Viçosa, Minas Gerais state, on dry and wet seasons. It was found both protozoans in the water, on lettuce, organic fertilizer and soil, at least in one plantation and one season. The main contamination source of both protozoans on lettuce was the water used on the irrigation. The number of microorganisms was affected by rainfall variations, and higher values were observed on the wet season. The microbiological contamination of water, lettuce, organic manure and soil was shown by different bacteriological analysis. It was observed high correlation between the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in all the types of samples, except by the fertilizer. High correlations between the protozoans and *C. perfringens* were found in water samples. The results denoted that some bacteriological indicators, such as the coliform group, cannot predict the presence of protozoans. Besides that, the turbidity of the different sources of water presented higher values on the wet season, which shows high correlation with the presence of *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. in irrigation water. The ability to remove *Cryptosporidium parvum* adhered to lettuce leaves, as pure culture and mixed with *Pseudomonas fluorescens*, was evaluated by using solutions of different concentrations

of benzalkonium chloride, Tween 80, and sodium dodecyl sulphate (SDS), after 10 minutes of contact. It was verified that SDS presented better protozoans removal, and its effectiveness increased as the concentration ($p < 0,05$). It was evaluated the ability to capture and retain oocysts of *C. parvum* by *P. fluorescens* biofilms established on polyvinylchloride (PVC) pipes. The number of captured oocysts was higher ($p < 0,05$) than the number of retained oocysts after increasing the flow in six times. It was verified that the oocysts present little ability to adhere to the PVC surface. The thermodynamic features related to the formation of *P. fluorescens* biofilm and *C. parvum* oocysts adhesion on PVC pipes were also evaluated. It was observed that the surfaces of *C. parvum* and *P. fluorescens* are hydrophilic, whereas PVC is a hydrophobic material. Such results were confirmed by quantifying the surface free energy (ΔG_{SWS}). The determination of the total free interaction energy denoted that the adhesion of *P. fluorescens* biofilm and *C. parvum* oocysts was thermodynamically favorable ($\Delta G_{\text{adesão}}^{\text{TOT}} < 0$) for all the conditions. The control of *P. fluorescens* biofilm and *C. parvum* oocysts adhered to PVC pipes was carried out by applying benzalkonium chloride. The tested concentrations of benzalkonium chloride led to an increase ($P < 0,05$) on the DR number of both microorganisms, as they were submitted to higher concentrations of surfactants. The application of benzalkonium chloride on higienization procedures can be an alternative to control bacteria and protozoan adhered to PVC pipes used on vegetable irrigation. However, some toxicological tests are necessary in order to evaluate the prejudicial effect of the suggested concentration.

INTRODUÇÃO GERAL

As hortaliças são essenciais para a saúde por serem importantes fontes de fibras, vitaminas e sais minerais, ressaltando-se o seu papel na dieta humana, uma vez que contribuem para todo o processo digestivo. Entretanto, quando contaminadas, são responsáveis pela veiculação de um grande número de microrganismos que podem causar doenças infecciosas, principalmente se consumidas cruas e, ou mal higienizadas.

A alface (*Lactuca sativa L.*) é a hortaliça folhosa mais vendida no Brasil, principalmente para consumo de suas folhas na forma de saladas cruas. O baixo custo de produção e a fácil comercialização fazem com que a hortaliça seja a preferida para o plantio pelos pequenos produtores, sendo de grande importância econômica e social no Brasil, o que estimula a permanência do homem no meio rural. Na cidade de Viçosa, as hortaliças provêm, em grande parte, de pequenas propriedades localizadas nas proximidades da sua área urbana. Posteriormente, esses produtos são distribuídos em feira livre, sacolões, supermercados e restaurantes.

Uma das principais fontes de contaminação de bactérias e protozoários, onde se incluem os gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia*, em hortaliças é a água de má qualidade usada na agricultura. O transporte de protozoários pela água através de tubulação utilizada para irrigação das hortaliças pode ser influenciado por interações com comunidades microbianas aderidas às superfícies, chamadas de biofilmes. Essas interações são de grande preocupação para o controle dos microrganismos uma vez que o desprendimento dos protozoários aderidos ao biofilme bacteriano e o transporte dos mesmos pelo fluxo de água podem acarretar em aumento da contaminação de hortaliças.

A adubação com esterco de animais e compostos orgânicos tem sido amplamente utilizada na produção de alface com o objetivo de melhorar a qualidade do solo proporcionando aumento da produção e no teor de nutrientes das folhas de alface. No entanto, o uso de adubo orgânico mal compostado constitui também uma fonte de contaminação importante. Além disso, a presença de protozoários em alface pode ser conseqüência do contato com o solo, do transporte e manuseio desses produtos, bem como decorrente do contato das hortaliças com animais. Somando-se a estes fatos, o hábito alimentar de consumir hortaliças *in natura* possibilita a exposição de uma grande parcela da população às formas de veiculação desses microrganismos.

É importante a adoção de medidas que propiciem a melhoria da qualidade de hortaliças consumidas cruas. Entre os procedimentos de higienização mais conhecidos ressalta-se a lavagem doméstica e a sanitização. Como essas hortaliças não podem ser submetidas à ação do calor, por exemplo, a aplicação de sanitizantes químicos, antes do consumo de verduras, tem sido a forma de controle microbiano mais utilizada. Entretanto, é sabido que esses tipos de sanitizantes nas concentrações recomendadas possuem ação bactericida, mas pouco efeito sobre inativação e remoção de protozoários. Dessa forma, o uso de surfactantes seria uma alternativa para garantir a segurança microbiológica de hortaliças ingeridas na forma crua.

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias das unidades produtoras de alface, visando principalmente a qualidade parasitológica e bacteriológica da água utilizada para irrigação, da alface, do adubo orgânico e do solo. Além disso, objetivou-se avaliar a capacidade de captura e de retenção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em tubulação de poli (cloreto de vinila) utilizada em irrigação de hortaliças. Esse estudo poderá fornecer dados para a vigilância sanitária e secretaria da agricultura sobre a situação higiênica da hortaliça mais consumida no Brasil, permitindo o controle das condições em que são cultivadas.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Fatores que contribuem para ocorrência de doenças de origem alimentar

Atualmente, são conhecidas mais de duzentas doenças associadas ao consumo de alimentos contaminados por patógenos. Os agentes etiológicos das doenças de origem alimentar incluem vírus, bactérias, protozoários, fungos e príons. Os sintomas dessas doenças variam de uma moderada gastroenterite a severas síndromes renais, hepáticas e neurológicas (MEAD et al., 1999).

Durante os últimos 25 anos, a indústria de alimentos tem sido desafiada pela emergência de novos microrganismos patogênicos como *Campylobacter* spp. no final dos anos de 1970 e *Escherichia coli* O157:H7 nos anos de 1990. Uma das razões para a emergência desses patógenos foram melhorias nos sistemas de detecção, primeiramente em microbiologia clínica, que têm identificado tais microrganismos como importantes agentes causadores de doenças em humanos. *Cryptosporidium* é considerado um patógeno emergente, que tem causado preocupações nos setores de processamento de alimentos e de tratamento de água. Além de outros fatores, essa preocupação pode ser justificada pelo fato de ainda não haver tratamento antimicrobiano efetivo para erradicar esse agente do trato gastrointestinal de portadores assintomáticos (MILLAR et al., 2002).

As doenças de origem alimentar, denominadas emergentes, têm ocorrido por várias razões, que incluem o aumento de viagens e comércio internacional, adaptação

de microrganismos a estresses ambientais, mudanças no sistema de produção de alimentos, mudanças no comportamento humano e distribuição demográfica. Todas essas mudanças trazem conseqüências, seja para o homem, seja para os microrganismos. Outro fator considerado, é que a população de pessoas susceptíveis está aumentando em todo mundo.

É observado atualmente, o envelhecimento da população, má-nutrição, infecções por HIV e outras condições clínicas subjacentes. A idade do indivíduo é um importante fator de susceptibilidade a infecções porque nos idosos, o sistema imunológico pode estar comprometido e não desenvolver ou perder a proteção às doenças de origem alimentar. O microrganismo pode invadir a corrente sanguínea e levar a uma doença mais severa. A severidade dessas doenças leva as altas taxas de mortalidade em idosos. Um outro grupo vulnerável são as pessoas imunocomprometidas, como portadores de HIV e câncer. Este grupo é infectado com uma dose mais baixa de patógenos, que não produziria reações em pessoas saudáveis. Indivíduos deste grupo podem morrer em função de infecções causadas por *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* e outros patógenos causadores de doenças veiculadas por alimentos e água. Problemas ainda maiores enfrentam os países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Nestes países, adultos e, particularmente, os recém-nascidos e as crianças apresentam imunidade reduzida devido ao estado de má nutrição em que se encontram, tornando-os ainda mais susceptíveis a estas doenças (FAO, 2004a; FAO, 2004b, WHO, 2004).

Observam-se, também, mudanças no estilo de vida, com um grande número de pessoas que fazem suas refeições em restaurantes comerciais e institucionais, cantinas, *fast foods* e vendedores de rua. Em muitos países, como ocorre no Brasil, observa-se o aumento de estabelecimentos de refeições rápidas, locais onde, provavelmente, não estão estabelecidas as boas práticas de higiene e controles da produção e da distribuição de alimentos. Nestas condições, as preparações são amplamente susceptíveis a contaminações, o que permite o crescimento de microrganismos patogênicos ou a sobrevivência de parasitas. Ainda, mudanças são capazes de tornar o microrganismo mais resistente e sobreviver em condições ambientais adversas (FAO, 2004a; FAO, 2004b, WHO, 2004).

1.2. Microrganismos patogênicos associados com produtos frescos

A presença de vários gêneros de bactérias deterioradoras, fungos filamentosos, leveduras e patógenos ocasionais em produtos frescos tem sido reconhecida por muitos anos. Vários surtos envolvendo gastroenterites humanas são associados ao consumo de vegetais frescos ou, em menor extensão, de frutas. Saladas que contêm como ingredientes vegetais crus têm sido identificadas como veículos de diarreia do viajante, doença que pode ocorrer por visitantes de países em desenvolvimento quando ingerem alimento contaminado por *Escherichia coli* enterotoxigênica (BEUCHAT, 1995).

Frutas e vegetais fazem parte da dieta de pessoas em todo o mundo e podem tornar-se contaminados com microrganismos patogênicos durante o crescimento em pomares e hortas ou nas etapas de colheita, pós-colheita, processamento e distribuição. Dessa forma, presença de fezes, solo, água de irrigação, esterco, poeira, animais domésticos e manipuladores são algumas fontes de patógenos em produtos frescos durante a colheita. Durante a pós-colheita podem ser consideradas fontes de contaminação de vegetais manipuladores, equipamento de colheita, caixas de transporte, animais domésticos e selvagens, água de rinsagem e lavagem, classificação, embalagem, corte, equipamento de processamento, gelo, veículo de transporte, contaminação cruzada, estocagem, embalagem e temperatura inadequadas.

Os patógenos capazes de causar doenças em humanos podem estar presentes na água utilizada para irrigação, no adubo ou no solo, no qual o produto cresce. Bactérias são uma grande preocupação em termos de severidade da doença e números de pessoas contaminadas em escala mundial (BEUCHAT, 1995). Entretanto, em décadas recentes, alguns protozoários têm sido reconhecidos como potenciais causadores de doenças de origem alimentar envolvendo produtos frescos (MONGE e CHINCHILLA, 1995; DAWSON, 2005).

1.3. Considerações e aspectos sanitários do cultivo de hortaliças

O consumo de hortaliças é essencial para a saúde por ser uma importante fonte de minerais na alimentação humana, entretanto, quando contaminadas, são

responsáveis pela transmissão de um grande número de doenças infecciosas, principalmente se consumidas cruas e, ou mal lavadas.

A alface (*Lactuca sativa L.*) é a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil, seu baixo valor calórico a qualifica para diversas dietas, o que favorece o seu consumo sob a forma crua. É cultivada durante o ano inteiro, em canteiros de terra, de maneira que os pés permanecem por todo o período de desenvolvimento em contato com o solo. Além disso, os vegetais necessitam de ambiente permanentemente úmido, o que requer a prática de irrigação constante das culturas, especialmente nos meses de seca. Estas condições, associadas à arquitetura das folhagens, propiciam a formação de ambientes extremamente favoráveis a sobrevivência e ao desenvolvimento das formas de transmissão de enteroparasitas, caracterizados sobretudo por umidade elevada e luminosidade baixa (SOUTO, 2005).

Segundo Pessoa e Martins (1988), a alface, por meio das secreções de suas folhas, pode facilitar a retenção e a sobrevivência de microrganismos pela formação de camadas isolantes protetoras. É importante enfatizar que a existência de formas detectáveis de enteropatógenos na alface não significa que as mesmas sejam efetivamente meios de propagação desses agentes.

Existem diferentes fatores que podem atuar, facilitando ou dificultando a veiculação destes parasitas ao homem. Relacionados aos patógenos tem-se dose infectiva; viabilidade de cistos, oocistos, ovos e larvas; ligados ao hospedeiro tem-se idade, imunidade e estado nutricional, entre outros (MORAES et al., 1984; PESSOA e MARTINS, 1988).

1.4. Possíveis fontes de contaminação microbiológica e parasitológica no meio rural

1.4.1. Água

Há uma relação direta entre saneamento e saúde e, nessa associação, a água assume o principal elo nesta interdependência. De várias maneiras, a água pode afetar a saúde humana: seja por meio da ingestão direta, na preparação de alimentos, ou pelo seu uso na higiene pessoal, na agricultura, indústria ou lazer. Os perigos para a saúde, relacionados com a água, podem ser distribuídos em três categorias principais relacionadas, segundo Pessoa e Martins (1988): Com a ingestão e com o contato direto

com água contaminada por agentes biológicos; Com a presença de insetos vetores que necessitam da água em seu ciclo biológico; Com a presença de poluição química e radioativa, geralmente resultante da contaminação por efluentes de esgotos industriais.

Os principais agentes biológicos encontrados nas águas contaminadas são as bactérias patogênicas, os vírus e os parasitas. Esses microrganismos encontrados na água ou nos alimentos constituem uma das principais fontes de morbidade no país. São os responsáveis pelos numerosos casos de doenças infecciosas, parasitárias, enterites e diarreias infantis, em alguns casos com resultados letais.

A água é essencial à vida, porém muitas vezes atua como veículo de transmissão de doenças ao homem, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica antes de ser utilizada tanto para fins de irrigação como para dessedentação ou recreação (ISAAC–MARQUEZ et al., 1994).

Freqüentemente se observa a disposição inadequada de esgotos domésticos, como também a deficiência de saneamento básico em alguns locais, contribuindo efetivamente para a contaminação dos recursos hídricos, inclusive dos lençóis freáticos, por matéria fecal (TAKAYANAGUI et al., 1996). No nordeste do Brasil, por exemplo, a escassez de recursos hídricos tem levado ao emprego indiscriminado de águas de córregos, açudes e rios contaminados com material fecal (DINIZ, 1994; CEBALLOS et al., 1997). Essa contaminação foi confirmada por Barros et al. (1999) que comprovaram, por meio de seus trabalhos, que propriedades do agreste e brejo paraibanos reutilizaram água de esgoto para irrigação de alfaces destinadas a consumo na forma crua.

Análises bacteriológicas demonstraram que a água de irrigação de cinco propriedades, localizadas em Maringá, PR, estava contaminada por dejetos fecais. Posteriormente foi evidenciado que estas propriedades tiveram suas hortaliças contaminadas devido à utilização desta água rica em enteropatógenos (GUILHERME et al., 1999).

As águas destinadas à irrigação são fontes originais de contaminação quando comportam grande quantidade de microrganismos como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, entre outros. Entretanto, alimentos que estão em contato direto com águas contaminadas e são consumidos crus constituem fontes prováveis desses microrganismos e merecem especial atenção, principalmente nos países em desenvolvimento, onde o estado nutricional da população é precário, interferindo diretamente nas condições

imunológicas dos indivíduos. Crianças, indivíduos imunodeprimidos ou debilitados são considerados grupos susceptíveis, favorecendo o aparecimento dessas enfermidades (PACHECO et al., 2002).

Alguns estudos, no Brasil, têm identificado verduras com alto grau de contaminação por coliformes fecais transmitidos pela água de irrigação (GUIMARÃES et al., 2003). Em Lavras, MG, as análises microbiológicas realizadas identificaram que quase a totalidade dos mananciais investigados apresentava contaminação por coliformes a 45 °C (ROCHA et al., 2002). Também foi constatada a presença acentuada desse grupo de bactérias nas águas de poços de duas regiões do Rio de Janeiro (FREITAS et al., 2001).

No município de Ribeirão Preto, foi pesquisado enteropatógenos em verduras e em água de irrigação proveniente de córrego. Constatou-se que essa fonte de irrigação era responsável pela contaminação de hortaliças por cistos e ovos de parasitas, sendo que a maior freqüência desses seres foi evidenciada na seca, período em que se fez necessário à utilização da água proveniente dos córregos (MARZOCHI, 1977).

Nos países em desenvolvimento, as doenças diarréicas, de veiculação hídrica, são responsáveis por vários surtos epidêmicos e pelas elevadas taxas de mortalidade infantil. Temos como exemplos dessas enfermidades bacterianas: febre tifóide, cólera, salmonelose e shigelose. As infecções virais são representadas por poliomielite e hepatite A, e as enfermidades provocadas por enteroparasitoses são devido à amebíase, criptosporidiose e giardiose (PACHECO et al., 2002).

Em estudo realizado no Canadá, foi possível o isolamento de *Escherichia coli* 0157: H7 das fezes de uma criança com diarréia sanguinolenta e na água do poço da fazenda onde ela residia. A mesma bactéria foi também isolada nas fezes de 63% dos bovinos dessa mesma propriedade (ERCOLE et. al., 2003). Segundo Kouba (2003) o dejetos bovino depositado no solo representa perigo de contaminação das fontes de água, uma vez que esses animais são reservatórios de diversos patógenos humanos.

O cultivo de produtos vegetais, especialmente de hortaliças, necessita de ambiente permanentemente úmido, o que requer irrigação constante das culturas, especialmente nos meses de seca. Um problema que afeta a qualidade higiênico-sanitária das plantações consiste na irrigação das culturas com águas provenientes de rios, córregos e lagos adjacentes às hortas. Essas águas são bombeadas ou levadas através de canais de irrigação que ocorre sem qualquer tratamento prévio. Algumas propriedades rurais contam com água de poço ou cisterna utilizada na lavagem e

higienização das hortaliças, mas não utilizam a água da rede pública, uma vez que o alto consumo exigido para a irrigação de hortaliças torna o custo bastante elevado (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002).

Em alguns países, a água utilizada para uso doméstico é a mesma utilizada para a irrigação. As águas utilizadas para irrigação também são fontes originais de contaminação, pois podem estar associadas com descargas de esgotos, contendo grande quantidade de contaminantes, como parasitas intestinais e outros. Nas localidades com saneamento básico deficiente, a destinação dos esgotos domésticos é feita com frequência nos rios e riachos, acarretando a contaminação das águas superficiais e até dos lençóis freáticos por matéria fecal. Atualmente, recomenda-se que estas águas apresentem padrões de qualidade mínimos, não somente sob aspecto microbiológico, como também parasitológico (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002),

1.4.2. Insumos naturais

Segundo Darolt (2003), a adição de adubo orgânico mal compostado ao solo pode ser uma fonte de contaminação microbiológica.

No processo de produção, os alimentos orgânicos são mais susceptíveis a contaminação biológica do que os convencionais por usar intensamente o adubo orgânico de origem animal. É sabido que o sistema convencional usufrui desse insumo, embora em menor quantidade. O ambiente úmido, associado a esterco provenientes de vários animais, favorece a manutenção e proliferação de microrganismos, ao contrário do que ocorre com a adubação química adotada pelo sistema de produção convencional (SILVA, 1995).

Segundo Nicholson (2000), não há informações suficientes disponíveis que declarem categoricamente que o risco de transferência de patógenos de fazendas orgânicas difere significativamente do risco associado com práticas de agricultura convencional. Portanto, é indispensável o desenvolvimento, por parte dos dois sistemas em questão, de técnicas eficientes na redução do risco de contaminação microbiológica, uma vez que ambos utilizam fertilizantes naturais (DAROLT, 2003).

1.4.3. Hábitos de higiene inadequados

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

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

Foi investigada a prevalência de enteroparasitas em hortaliças e horticultores de Maringá, no Paraná. Entre os parasitas encontrados nas hortaliças dessa região, houve predominância de *Entamoeba coli*, que também se mostrou presente em alguns horticultores que se propuseram a fazer tal exame. Estas análises foram essenciais na comprovação da possível contaminação fecal desses produtos pelos horticultores, evidenciando as baixas condições higiênicas existentes entre os produtores da região (GUILHERME et al., 1999).

Sabendo que os trabalhadores agrícolas podem ter um impacto importante na segurança sanitária dos produtos que cultivam, é de extrema importância que os mesmos adotem procedimentos sanitários corretos. No entanto, muitos desses trabalhadores se recusam a empregar práticas higiênicas simples, como lavar as mãos após utilização de sanitários (BRACKETT, 1999). Isto mostra que a realização de ações educativas sobre os preceitos básicos de higiene pessoal é indispensável, visando sensibilizar essas pessoas sobre os problemas acarretados aos consumidores pelos produtos provenientes de práticas inadequadas.

1.5. Enteroparasitas causadores de infecções alimentares

Os parasitas intestinais são organismos patogênicos que podem ser encontrados em diferentes partes do trato gastrointestinal dos seres humanos, estando compreendidos em dois grandes grupos de organismos, os protozoários e os helmintos. Ao contrário das bactérias causadoras de doenças alimentares, os

enteroparasitas não se proliferam nos alimentos nem crescem em meios de cultura, sendo necessário, portanto, que sua presença seja detectada pelo uso de procedimentos apropriados de concentração e coloração. Além disso, esses microrganismos necessitam de um hospedeiro para manter seu ciclo de vida (JAY, 2005).

As parasitoses intestinais, pela sua elevada prevalência e pela diversidade de manifestações clínicas, inclusive sobre o estado nutricional, representam um problema de grande importância em Saúde Pública, uma vez que aproximadamente um terço da população brasileira vive em condições ambientais propícias à disseminação das infecções parasitárias (SALDIVA et al., 1999; PRADO et al., 2001; MUNIZ e QUEIROZ, 2002; FERREIRA et al., 2003). Verifica-se que as doenças parasitárias prevalecem nos países pobres, onde há precárias condições de moradia, poucos recursos financeiros, e por conseqüência, falta de alimentação adequada, saúde e estrutura familiar inadequadas (MIRANDA, et al., 1998; LUDWIG et al., 1999; FERREIRA et al., 2003). Trabalhos mostram uma menor incidência de enteroparasitoses nas regiões onde o processo de desenvolvimento melhorou as condições de saneamento e abastecimento de água (GRILLO et al., 2000; COULTER, 2002).

O Brasil possui clima e situação sócio-econômica favoráveis a ocorrência de doenças parasitárias. Tanto nas áreas rurais quanto urbanas, nos países em desenvolvimento, as parasitoses intestinais são amplamente difundidas, devido às baixas condições sanitárias, sendo que as hortaliças servem como um dos principais veículos de transmissão de enfermidades intestinais (BRANCO JÚNIOR e RODRIGUES, 1999).

As condições de higiene ambiental refletem as condições sanitárias nas quais vive o homem e estas, por sua vez, parecem exercer profunda influência na cadeia de transmissão das enteroparasitoses. O indivíduo parasitado, pelos seus dejetos, contamina seu próprio ambiente com ovos, cistos e larvas de parasitas intestinais, e a água pode acumulá-los e transportá-los a grandes distâncias. Assim as fezes representam o veículo e a fonte de contaminação de todos os parasitas intestinais (WANDERLEY et al., 2000; COULTER, 2002).

Os protozoários que freqüentemente parasitam os seres humanos são *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2003). Mais recentemente, os coccídeos *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli* e *Cyclospora cayetanensis* e os microsporídios surgem como protozoários emergentes,

principalmente com o advento da Aids (CIMERMAN et al., 1999; MANZI e GARCIA-ZAPATA, 2000; USEPA, 2001). Um grupo que também merece referência são os protozoários comensais, exemplificados, principalmente, por *Entamoeba coli* e outros também freqüentemente identificados em fezes humanas como *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii* e *Eimeria sardinae*. Esses protozoários não são patogênicos para os seres humanos, entretanto, apresentam importância pelo fato de apresentarem mecanismos de transmissão semelhantes aos protozoários patogênicos (SILVA e GOMES, 2003).

Os protozoários podem entrar no processo de produção por três rotas principais: i) através de contaminação de ingredientes alimentícios ou de matéria-prima crua; ii) através de água contaminada adicionada ao produto final para irrigação, lavagem ou processamento, ou ainda, usada para limpeza de equipamentos de processamento e iii) através de manipuladores de alimentos que cometem falhas nos procedimentos de higiene pessoal (DAWSON, 2005).

Esse estudo dará enfoque aos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

1.5.1. Criptosporidiose

A criptosporidiose é uma doença causada pelo protozoário *Cryptosporidium* spp. que foi isolado pela primeira vez em 1907 em um roedor assintomático. Pertence ao filo *Apicomplexa*, classe *Coccidia*, subclasse *Coccidiasina*, ordem *Eucoccidiorida*, subordem *Eimeriorina*, família *Cryptosporididae* (CAREY et al., 2004). Esse protozoário tem sido reconhecido como patógeno de, pelo menos, 40 mamíferos, vários répteis e pássaros. Apesar de o primeiro caso humano ter sido registrado em 1976, a criptosporidiose existe em todo o mundo com prevalência de 1 a 4% em pacientes com sintomas de diarreia. *Cryptosporidium* spp. é um parasita intestinal que acomete seres humanos, mamíferos domésticos e outros animais, desenvolvendo-se, preferencialmente, nas microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal, causando diarreia intensa, com sério comprometimento quando ocorre em indivíduos imunocomprometidos (TZIPORI e WARD, 2002).

Cryptosporidium não é capaz de se multiplicar fora de um hospedeiro. Embora, esse protozoário seja capaz de sobreviver por um longo período no ambiente, a viabilidade e infectividade decrescem com o tempo (HOORNSTRA e HARTOG, 2003). Ao contrário da maioria das bactérias, com exceção de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp.,

esse parasita desenvolveu um estágio de dormência, como parte do seu ciclo de vida complexo, na forma de oocistos. Assim, esse estágio de oocisto permite que o organismo esteja viável, contudo permanece dormente, esperando a oportunidade de infectar um hospedeiro susceptível novo e perpetuar seu ciclo de vida nesse hospedeiro. A infecção se dá pela ingestão de oocistos em alimentos ou água contaminada. No trato gastrointestinal, ocorre o desencistamento da estrutura liberando os trofozoítos. Esses atingem a parede do intestino e iniciam seu ciclo reprodutivo, desencadeando alterações no organismo acometido. Diferente da composição dos esporos bacterianos, pouco é conhecido sobre a composição química dos oocistos e como essa composição está associada com a capacidade de sobrevivência desse protozoário (MILLAR et al., 2002).

Devido ao período de incubação da criptosporidiose ser demorado, de 2 a 11 dias, é difícil identificar o alimento e a fonte de infecção. Além disso, a falta de métodos de rotina para detecção desse protozoário em alimentos também tem prejudicado as investigações epidemiológicas. Uma preocupação é que a dose infectiva é baixa, podendo ser 10 oocistos, dependendo do genótipo do *Cryptosporidium*. Porém, a dose infectiva média foi estabelecida em torno de 130 oocistos (SCHLUNDT et al., 2004).

Os oocistos de *Cryptosporidium* são esféricos, possuem, em média, 4 a 6 µm de diâmetro e apresentam quatro estruturas infectivas formadas, os esporozoítos (DAWSON, 2005). Os oocistos são liberados em elevadas concentrações nas fezes de animais, principalmente bezerros e humanos infectados, podendo ser acima de 10^{10} oocistos durante a fase aguda da doença. A diarreia é o sintoma mais comum da infecção causada por *Cryptosporidium*, seguida de dor abdominal e vômito. A doença possui um período sintomático mais longo do que a maioria das infecções intestinais, durando de uma a duas semanas, com uma completa recuperação em pessoas imunocompetentes. Em indivíduos imunodeprimidos, a doença pode ser muito mais severa e persistente, com invasão de órgãos, como pulmões e ducto biliar. Algumas drogas podem controlar o protozoário, porém, não há um tratamento confiável para eliminar a infecção (FAYER, 2004).

Esse protozoário está amplamente distribuído no ambiente e associado com vários surtos de infecções devido, entre outros fatores, ao uso de águas superficiais contaminadas por fezes. As primeiras chuvas no ambiente urbano, suburbano e rural podem levar os oocistos desse parasita intestinal para águas que serão usadas na agricultura, para recreação e, em alguns locais, para beber (FAYER et al., 2000).

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos mananciais aumenta a preocupação com a veiculação do parasita, porque enquanto ocorre por contato com utensílios contaminados, de pessoa a pessoa, animal a pessoa, restringe-se o número de pessoas infectadas, no entanto, quando ocorre por veiculação hídrica pode atingir facilmente um grande contingente da população (LIMA e STAMFORD, 2003).

Smith (1998) descreve sobre as diversas razões para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. tornarem-se patógenos importantes de transmissão hídrica: provocam infecções com baixa dose infectante, as densidades de contaminação ambiental com oocistos e cistos infectantes são suficientes para poluir o ambiente aquático e os oocistos são bastante pequenos para atravessar o processo de tratamento da água, além de serem resistentes aos sanitizantes comumente empregados nesse tratamento.

O primeiro surto de criptosporidiose, que vitimou 79 pessoas, ocorreu em 1984 no Texas, sendo diagnosticado por um estudo epidemiológico, portanto sem a confirmação do parasita na água de poço suspeita. A partir desse, outros surtos envolvendo água foram descritos e, dentre aqueles de maior impacto estão os que ocorreram na Geórgia em 1987, onde 13.000 pessoas foram afetadas e em Saitama, no Japão, em 1996, quando 8.705 indivíduos foram acometidos, sendo *Cryptosporidium* detectado em água tratada e não tratada. Em Oregon houve 15.000 pessoas com sintomas de criptosporidiose e o protozoário foi detectado na água em processo de tratamento. Em Milwaukee, Wisconsin, em 1993, *Cryptosporidium* foi encontrado na água potável devido à contaminação do lago Michigan e, conseqüentemente, remoção inadequada de oocistos pelos processos de coagulação e filtração no tratamento da água. A ocorrência desse surto envolveu 403.000 pessoas infectadas e dessas 4.400 foram hospitalizadas, havendo 104 mortes, 69 em pacientes HIV positivos (DAWSON, 2005; LIMA e STAMFORD, 2003).

Dentre as fontes de contaminação das águas destacam-se a contaminação cruzada de águas de poço ou encanada por água de esgoto, falhas nos procedimentos operacionais, desvios no filtro de areia, contaminação de águas superficiais por esterco bovino e influências de efluentes industriais e agrícolas nas águas de recreação (SMITH, 1998).

Um dos problemas para controlar a infecção é a escassez de dados sobre a real ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em mananciais aquáticos potáveis, levando a uma subestimação de casos de criptosporidiose e, muitas vezes, a associação de surtos

seguidos de óbito com outros patógenos, particularmente o agente etiológico da cólera (LIMA e STAMFORD, 2003).

A importância do estudo sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em ambiente aquático foi reforçada pelas citações da Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), que recomenda a inclusão da pesquisa de *Cryptosporidium* spp. para se atingir o padrão de potabilidade da água. Apesar dos coliformes termotolerantes serem considerados referência mundial como indicador microbiológico para água e alimentos, ainda há dúvidas se essas bactérias são realmente boas indicadoras para protozoários. Isso vem alertar e despertar o interesse de empresas de saneamento para o seu enquadramento na referida legislação, cujos recursos se baseiam na associação da ocorrência do protozoário com parâmetros de previsibilidade e, principalmente, na sua pesquisa direta em amostras de água. A escolha de um método de pesquisa a ser empregado em análise de rotina depende de alguns fatores, dentre eles o custo-benefício associado a recomendações previstas em normas oficiais para o padrão de ausência de *Cryptosporidium* spp. (LIMA e STAMFORD, 2003).

Trabalhos realizados em diferentes regiões geográficas do Brasil detectaram a presença de *Cryptosporidium* na água bruta, inclusive no estado de Minas Gerais (GOMES et al., 2002; HELLER et al., 2004; NETO e FRANCO, 2004) e nos mananciais que abastecem o município de Viçosa, MG (OLIVEIRA, 2004). Dados obtidos por GAMBA et al. (2000) mostraram a presença de oocistos em poços localizados na cidade de Itaquaquecetuba, SP.

Além da água, *Cryptosporidium* pode ser veiculado por alimentos. Particularmente, os produtos frescos, que são consumidos com um mínimo de preparo, são veículos potenciais de transmissão desse protozoário (FAYER et al., 2000).

Oocistos de *Cryptosporidium* foram isolados de coentro e alface na Costa Rica (MONGE E CHINCHILA, 1995) e no Peru, em que 4,5% dos vegetais avaliados em uma pesquisa continham oocistos (ORTEGA et al., 1997). Uma pesquisa realizada na Noruega mostrou que de 475 amostras de frutas e vegetais examinados, 19 delas veiculavam *Cryptosporidium*, sendo cinco amostras de alface e 14 de broto de feijão (ROBERTSON e GJERDE, 2001).

Hortaliças também foram investigadas e foi detectada presença de *Cryptosporidium* em vegetais frescos, como rúcula e alface, em Ribeirão Preto, SP (CAPUANO et al., 2001), alface em Recife, PE (SILVA et al., 2005). Apesar de pesquisas confirmarem a presença, ainda há poucos registros de surtos implicando

alimentos como veículos de transmissão desse protozoário. Uma preocupação crescente é a resistência de oocistos de *Cryptosporidium* a sanitizantes, como o cloro (FAYER, 2004).

Além de água e hortaliças, outros alimentos podem veicular *Cryptosporidium*. Um exemplo clássico foi o surto ocorrido em 1993, nos Estados Unidos, que foi associado ao consumo de cidra de maçã não pasteurizada, processado com maçãs coletadas do chão que estavam contaminadas com fezes de gado. A cidra, com pH entre 3,6 e 4,0, veiculou dois patógenos, *Cryptosporidium* e *Escherichia coli* O157:H7 (MILLARD et al., 1994). O *Codex Alimentarius* sugeriu o uso da análise de risco para *Cryptosporidium* em água, alface e carne (HOORNSTRA e HARTOG, 2003).

1.5.2. Giardiose

Giardia spp. é um protozoário flagelado pertencente ao sub-filo *Mastigofora* capaz de habitar a parte superior do intestino delgado de seus hospedeiros causando giardiose, uma doença intestinal comum na população humana, caracterizada principalmente por diarreia aquosa. Sua primeira descrição foi feita por Leeuwenhoek, em 1681, que descreveu o parasita em suas próprias fezes. Entretanto, uma descrição mais detalhada foi atribuída a Lambl, em 1859 (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2003). Esse protozoário apresenta-se em dois estágios no ciclo de vida: trofozoíto reprodutivo e cisto resistente ambientalmente. O cisto ingerido passa pelo duodeno, onde o desencistamento ocorre, liberando dois trofozoítos. Esses então se multiplicam rapidamente via reprodução assexuada e colonizam o intestino delgado. É durante o estágio de trofozoíto que os sintomas da doença ocorrem, como resultado de danos na membrana mucosa. Os trofozoítos contêm dois núcleos e quatro flagelos, o que lhes permite exibir motilidade. Os cistos possuem formato ovóide com 9 a 12 µm de comprimento e 5 a 12 µm de largura e são liberados nas fezes. Trofozoítos também são liberados, contudo, não são infectivos (DAWSON, 2005).

O mecanismo de transmissão da giardiose é, principalmente, do tipo fecal-oral através da ingestão de cistos. Os cistos são de fácil dispersão no meio ambiente e, por isso, a contaminação ambiental com fezes humanas ou animais é importante fator de manutenção da doença na população (USEPA, 1998; SOGAYAR e GUIMARÃES, 2003). O período de incubação da giardiose em humanos varia de 7 a 13 dias. A doença apresenta como sintomas típicos diarreia, inchaço abdominal, flatulência, com

fezes gordurosas e, geralmente, há perda de peso (DAWSON, 2005; JAY, 2005). Os cistos aparecem nas fezes após 3 a 4 semanas e são excretados em concentrações aproximadas de 10^7 por grama de fezes (SMITH e GRIMASON, 2003). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), a dose infecciosa está entre 10 a 100 cistos.

É comum encontrar *Giardia* em fezes de animais domésticos, gado e animais selvagens, mas não é considerado como causa relevante de doenças animais. Cistos de *Giardia*, assim como os oocistos de *Cryptosporidium* podem ser encontrados em efluentes de esgoto, águas superficiais e nascentes. Entretanto, ainda não está claro como muitos desses cistos detectados em amostras animais e ambientais representam estirpes que são infecciosas para humanos (THOMPSON, 2000). Os cistos são infecciosos quando liberados nas fezes e podem permanecer nesse estado por períodos longos em refrigeração, ambientes úmidos e por mais de 77 dias a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (WHO, 2004).

A água é uma das fontes de contaminação por *Giardia*. Populações abastecidas com água oriunda de mananciais superficiais sem filtração ou de mananciais subterrâneos contaminados com águas superficiais ou residuárias apresentam elevado risco de infecção por esse protozoário (USEPA, 1998). O primeiro surto registrado ocorreu em 1965 em um hotel em Aspen, Colorado, com 123 casos (CRAUN, 1988). Entre 1965 a 1977, 23 surtos relacionados à água foram registrados afetando mais de 7.000 pessoas (CRAUN, 1979). Entre 1971 a 1985, 92 surtos foram relatados nos Estados Unidos (CRAUN, 1988). Cistos de *Giardia* são, geralmente, resistentes às concentrações de cloro utilizadas em sistemas de abastecimento de água. Em um estudo com 220 amostras de fezes proveniente de ratos silvestres coletadas de águas naturais no sudoeste de Nova Jersey, 70% continham cistos de *Giardia* (KIRKPATRICK e BENSON, 1987).

Outras formas de transmissão de *Giardia* incluem o consumo de hortaliças cruas, irrigadas com água contaminada com efluentes domésticos; atividade sexual entre homossexuais, provavelmente resultante da transmissão fecal-oral; transmissão direta entre pessoas, principalmente em ambientes coletivos onde as medidas de higiene são precárias e consumo de alimentos crus, manipulados por indivíduos doentes ou portadores assintomáticos com hábitos de higiene inadequados (USEPA, 1998; SOGAYAR e GUIMARÃES, 2003).

Na literatura, pelo menos um surto com evidências epidemiológicas e laboratoriais indicou que vegetais crus podem veicular *Giardia*. Em tal surto um manipulador assintomático preparou uma salada de vegetais (MINTZ et al., 1993). Em um estudo realizado para verificar a contaminação microbiológica de alfaces em Roma, foi observada presença de cistos de *Giardia* em 48 do total de 64 pés avaliados (BANARD e JACKSON, 1984).

Foi sugerido que manipuladores de alimentos de hospitais são a origem mais provável de infecções por protozoários nos pacientes. Dos 844 pacientes particulares de um centro urbano, 36% contraíram giardiose e suspeitou-se que a infecção fora adquirida pela ingestão de frutas e vegetais crus contaminados por cistos (BANARD e JACKSON, 1984; DAWSON, 2005).

Na Ilha da Madeira em Portugal, aproximadamente 1.400 pessoas contraíram giardiose, sendo que os alimentos envolvidos com o surto foram sorvete e vegetais crus, além de água de torneira (LOPEZ et al., 1978).

Em Minnesota, 29 dos 60 funcionários de uma escola rural comunitária contraíram a doença a partir de uma conserva de salmão caseira preparada por uma trabalhadora que trocara fraldas de uma criança que tinha uma infecção assintomática por *Giardia* (OSTERHOLM et al., 1981).

Em Connecticut, 13 dos 16 indivíduos presentes em um piquenique, desenvolveram a doença 6 a 20 dias após a ingestão de salada de macarrão. O preparador da salada desenvolveu a doença no dia seguinte à ingestão (PETERSEN et al., 1988).

Um surto de *Giardia* envolveu 25 pessoas numa festa familiar. Nove pessoas que comeram salada de frutas na festa ficaram doentes. A pessoa que preparou a salada tinha uma criança que ainda usava fraldas e um coelho de estimação que foram ambos positivos para *Giardia lamblia* (PORTER et al., 1990).

Mais recentemente, a importância da água e dos alimentos na transmissão de *Giardia* é destacada por outros surtos de giardiose ocorridos nos Estados Unidos. Em 2003, ocorreu um surto provocado por *Giardia* em Massachusetts pelo contato com de água de piscina contaminada em um clube acometendo mais de 105 pessoas (KATZ et al., 2006). Nesse mesmo ano, cerca de 100 pessoas foram infectadas por *Giardia* e, ou *Cryptosporidium* após se banharem em água proveniente do sistema de abastecimento municipal de Iowa (DIZIUBAN et al., 2006). Em 2004, o consumo de água de poço contendo alguns tipos de microrganismos patogênicos, incluindo *Giardia*, devido ao

contato com esgoto, resultou na contaminação de 1450 pessoas em Ohio (O'REILLY et al., 2007). Surtos de origem alimentar associados com gelo, hortaliças e saladas com frango também foram relatados em 2004 e 2005 (CDC, 2007).

Em Palermo, na Itália, apesar de um estudo de 40 amostras de saladas prontas para consumo não ter detectado a presença de *Cryptosporidium* e apenas uma amostra ter apresentado cistos de *Giardia*, também foi sugerido que esses parasitos fossem incluídos na análise de perigos e pontos críticos de controle de indústrias ou setores que manipulam produtos vegetais frescos prontos para o consumo (DI BENEDETTO et al., 2007).

Os surtos provocados por contaminação de cistos de *Giardia* envolvendo água e alimentos enfatizam a importância do tratamento correto da água de abastecimento, de boas práticas higiênicas no preparo de alimentos e a possibilidade de transmissão desse protozoário via animais domésticos-pessoas (DAWSON, 2005).

1.5.3. Fatores que afetam a sobrevivência de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*

A fim de minimizar o impacto sobre a saúde pública, é necessário estabelecer medidas de controle ou preventivas nas etapas de produção e processamento de alimentos. Tais medidas são melhores estabelecidas antes que o incidente ocorra. Dessa forma, é importante conhecer alguns fatores que afetam a sobrevivência de *Cryptosporidium* e *Giardia* como condições ambientais, pH, aquecimento, congelamento, desidratação, sanitizantes, entre outros.

Alguns sanitizantes químicos foram testados sobre oocistos de *Cryptosporidium* e constatou-se que os mais efetivos e mais tóxicos foram componentes de baixo peso molecular como amônia, óxido de etileno, metil brometo e ozônio. Talvez, dentre esses sanitizantes, somente o ozônio tenha uso prático (FAYER et al., 1997; DAWSON, 2005).

Compostos clorados, apesar de serem efetivos contra muitos microrganismos, possuem pouco impacto sobre a viabilidade de oocistos nas concentrações usadas para tratamento de água de abastecimento público e de piscinas (CARPENTER et al., 1999). Entretanto, a utilização de ozônio e luz ultravioleta tem aplicabilidade para desinfecção dos oocistos de *Cryptosporidium* em sistemas de abastecimento de água (ROSE et al., 1997; CLANCY et al., 2000; KANJO et al., 2000). Tratamentos com mais

de um agente químico como de cloro e monocloramina, ou então, de ozônio e monocloramina têm demonstrado maior desinfecção do que a exposição a um único sanitizante (DAWSON, 2005).

Vários estudos de inativação de *Cryptosporidium* por exposição aos raios UV têm sido realizados em laboratório, mas apenas um trabalho testou a inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* por insolação. A exposição à irradiação solar pode representar um importante fator na inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* presentes em diferentes tipos de coleções hídricas (KING et al., 2008). Este fator poderia ter efeito positivo no Brasil, principalmente onde há muitas horas de insolação solar, como nas regiões Nordeste e Norte.

Cistos de *Giardia* são um perigo a sistemas de abastecimento de água devido a sua resistência a compostos clorados. Embora *Giardia* seja mais susceptível do que *Cryptosporidium*, ambos possuem maior resistência ao cloro quando comparados às bactérias e sobrevivem às concentrações utilizadas no tratamento da água (LEE, 1992; SMITH, 1993). Segundo Dawson (2005), cistos de *Giardia* podem ser mais facilmente removidos na etapa de filtração da água devido ao seu tamanho maior quando comparada aos oocistos de *Cryptosporidium*. Hayes et al. (2003) verificaram que a utilização de luz ultravioleta a $2,3 \text{ mJ.cm}^{-2}$ sobre superfície da água foi capaz de reduzir quatro ciclos logarítmicos da concentração inicial de cistos de *Giardia muris*.

Fayer e Nerad (1996) mostraram que ratos permaneciam doentes quando infectados com oocistos de *Cryptosporidium* submetidos a temperaturas de congelamento como $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h e $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ por 168 h. Entretanto, quando aplicaram nos oocistos o tratamento de $-70,0 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h, foi verificado que os mesmos perdiam a infectividade. Mahbubani et al. (1991) verificaram que cistos de *Giardia* não resistiram a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h.

Em temperaturas acima de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ foi observada uma redução no tempo de sobrevivência dos oocistos de *Cryptosporidium*. Quando submetidos a $54,4$, $59,9$ e $67,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por um minuto, foram capazes de causar infecção em ratos. Embora, esses animais não terem apresentado a doença quando receberam o inóculo anteriormente tratado com aquecimento de $72,4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min (FAYER, 1994). HARP et al. (1996) submeteram água e leite ao aquecimento de $71,7 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 s em equipamento comercial de pasteurização e observaram que esse tratamento foi suficiente para não causar infecção nos ratos avaliados. Também foi comprovado que cistos de *Giardia* não sobrevivem a tratamento de $71,7 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 s (WHO, 2004).

Kniel et al. (2003) verificaram que os ácidos málico, cítrico e tartárico reduzem a infectividade de oocistos de *Cryptosporidium* em mais de 88 %. Isso também foi observado quando se utilizou etanol e baixa atividade de água (DAWSON et al., 2004). Foi observada perda de mais de 85 % de viabilidade de oocistos quando submetidos a suco de laranja ou a uma bebida carbonatada com pH 3,9 a 4,0 ou 22 °C (FRIEDMAN et al., 1997).

A secagem também afeta a viabilidade dos oocistos. Isso foi comprovado por Deng e Cliver (1999) ao observarem a morte, dentro de 4 h à temperatura de 25 °C, de 95 % do total de oocistos avaliados. Em outro estudo, 10⁶ oocistos perderam a viabilidade em 4 h quando secos em ar corrente à 22 °C (ROBERTSON et al., 1992). Além disso, esses mesmos autores verificaram viabilidade em oocistos presentes em água de rio e fezes de vaca por seis meses.

1.6. Correlação entre parâmetros de qualidade da água e presença de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*

A comparação entre os parâmetros microbiológicos e físico-químicos de qualidade da água com a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. é um subsídio para prever a sua ocorrência no ambiente aquático e, com isso, orientar quanto à realização dos tratamentos empregados e aos procedimentos preventivos (MEDEMA et al., 1998).

Historicamente, bactérias indicadoras de origem fecal, onde se incluem coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e *Enterococcus*, são usadas em muitos países como ferramentas de monitoramento microbiológico da água e para predizer a presença de bactérias patogênicas, vírus e protozoários. Esses microrganismos indicadores são, em sua maioria, de origem fecal e sua presença em água e alimentos pode indicar contaminação fecal e uma possível associação com patógenos entéricos, inclusive protozoários como *Cryptosporidium* e *Giardia*. Entretanto, algumas limitações associadas com suas aplicações como, por exemplo, curta sobrevivência em corpos d'água, origem não fecal, incapacidade de identificação da fonte de contaminação fecal, baixos níveis de correlação com a presença de patógenos, baixa sensibilidade dos métodos de detecção, entre outros, têm sido amplamente relatadas. Dessa forma, nenhuma bactéria indicadora usada atualmente apresenta todos os critérios ideais

estabelecidos para a qualidade de água e de alimentos (SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006).

Alguns parâmetros indicadores alternativos, de origem biológica ou não, têm sido correlacionados com a presença de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* tais como: (i) bactérias formadoras de esporos anaeróbios, como *Clostridium perfringens* (ii) bactérias formadoras de esporos aeróbios, como *Bacillus subtilis* e (iii) medida de turbidez da água. O uso de indicadores alternativos juntamente com marcadores fecais convencionais é promissor na identificação da origem da poluição fecal e patógenos associados (SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006; SAVIOLI et al., 2006).

Alguns autores têm mostrado que *C. perfringens* tem sido usado com sucesso como indicador fecal para águas contaminadas com esgoto (SCHIJVEN, et al., 2002). Essa espécie é considerada também como um indicador promissor da eficiência dos processos de tratamento de água e da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (RADZIMINSKI et al., 2002; SCHIJVEN, et al., 2002; SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006;).

Esporos aeróbios de espécies de *Bacillus* têm se mostrado relativamente resistentes ao ozônio e compostos clorados, assim como ocorre com oocistos de *Cryptosporidium*. Dessa forma, *B. subtilis* tem sido proposto por alguns pesquisadores como modelo para ocorrência de *C. parvum* (FACILE et al., 2000; OWENS et al., 2000).

Outro parâmetro relevante que tem sido associado com a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. é a determinação de coliformes. Lechevallier et al. (1991) demonstraram uma correlação positiva entre a ocorrência de coliformes e de *Cryptosporidium* spp, porém o fato não está bem elucidado, conforme literatura disponível e autores têm demonstrado o contrário (GAMBA et al., 2000; SHEPHERD e WIN-JONES, 1996).

Dentre os fatores envolvidos na mensuração da qualidade da água, a turbidez é um importante parâmetro, pois devido à facilidade de aderência dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. a compostos orgânicos e inorgânicos. Assim, a presença desses protozoários tem sido associada ao grau de turbidez na amostra, de forma que quanto maior o grau de turbidez na amostra de água, maior a possibilidade de se encontrar o protozoário, tanto na água não-tratada como na tratada (MEDEMA et al., 1998).

De acordo com a Portaria nº 518/MS (BRASIL, 2004), para garantir a qualidade bacteriológica da água deve-se ter turbidez máxima de 1,0 UNT em 95% das amostras analisadas após o processo de filtração rápida, mas no que se refere à remoção de *Cryptosporidium* spp. é recomendado um valor máximo de 0,5 UNT para o grau de turbidez. No entanto, tem-se observado que os oocistos ainda ocorrem quando a turbidez encontra-se com o valor de 0,19 UNT, de forma que a garantia de segurança efetiva seria obtida com a turbidez de 0,1 UNT (LECHEVALLIER et al., 1991). Estudo realizado por Franco et al. (2001) também mostrou a associação do grau de turbidez e presença de *Cryptosporidium*, onde a identificação de oocistos nas águas do rio Atibaia em Campinas e a alta turbidez das amostras foram justificadas pelas intensas chuvas no período da pesquisa.

1.7. Interações entre biofilmes bacterianos e oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Como já foi visto, oocistos de *Cryptosporidium* estão distribuídos amplamente no ambiente e foram associados a surtos de infecções, principalmente devido ao uso de águas contaminadas em sistemas de abastecimento público, sistemas de irrigação agrícola, recreação, entre outros (FAYER et al., 2000).

A ocorrência de contaminação da água utilizada para diversas finalidades deve-se cada vez menos ao aumento da quantidade de microrganismos viáveis sobreviventes ao processo de tratamento e desinfecção ou a qualquer outra fonte de contaminação externa, uma vez que os sistemas de tratamento e distribuição são cada vez mais eficientes. Assim, o crescimento microbiano, principalmente sob a forma de biofilmes, assume um papel primordial nas alterações da qualidade da água, resultante da erosão e do desprendimento de porções do biofilme para a água circulante, influenciando diretamente a qualidade da água (CHAVES, 2004).

O monitoramento dos biofilmes, o conhecimento e a compreensão dos fatores que influenciam o seu desenvolvimento, apresentam-se como um passo fundamental para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento para obter água de qualidade em qualquer ponto do sistema de distribuição seja para uso em abastecimento público, na indústria de alimentos ou na agricultura (ANGLES et al., 2007).

Para melhor compreensão da forma como um biofilme pode afetar a qualidade da água e intervir no seu processo de contaminação é essencial conhecer a definição e o modo como vários fatores influenciam a formação desta película biológica.

Biofilmes são compostos por microcolônias de organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários (KEEVIL, 1989), cujas células encontram-se imobilizadas em um substrato e, frequentemente, embebidas em uma matriz polimérica orgânica por eles sintetizada (HALL-STOODLEY et al., 2004). É uma acumulação na superfície que não é necessariamente uniforme durante um período de tempo e espaço (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990). Representa um sistema biológico com alto grau de organização, onde bactérias formam comunidades funcionais, estruturadas e coordenadas (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Dada a evidência que, além de bactérias, outros microrganismos podem estar associados aos biofilmes, é provável que oocistos de *Cryptosporidium* podem também se tornar incorporados nessa complexa comunidade microbiana. Foi comprovado que oocistos de *Cryptosporidium* são capazes de incorporar, persistirem e subsequentemente desprenderem da matriz do biofilme. Uma grande preocupação é dada com relação ao destino desses oocistos após o seu despreendimento de biofilmes (ANGLES et al., 2007).

Há carência de relatos em literatura que demonstram detalhes sobre as interações existentes entre biofilmes bacterianos e oocistos de *Cryptosporidium*. Assim, há necessidade de realização de pesquisas que envolvem: as associações entre biofilmes bacterianos e protozoários; os fatores que contribuem para a persistência de oocistos nesse ambiente; quanto tempo os oocistos permanecem viáveis e podem ser detectados após a contaminação inicial. Essa falta de conhecimento cria um grau de incerteza durante as situações incidentes e reduz a capacidade de avaliar precisamente os perigos à saúde pública (ANGLES et al., 2007).

Biofilmes bacterianos podem estar presentes em sistemas de distribuição de água potável. A água que circula nas redes de distribuição está longe de constituir um produto puro e estável. Na maior parte dos casos, a rede transporta uma água que respeita as normas de qualidade. No entanto, a densidade dos microrganismos presentes nas tubulações da rede pode aumentar com o tempo de residência e, ou com a distância entre a estação de tratamento e o utilizador diminuindo, assim, a qualidade da água fornecida (CHAVES, 2004).

O tratamento da água é primariamente uma barreira físico-química de prevenção de *Cryptosporidium* na entrada do sistema de distribuição. De acordo com Betancourt e Rose (2004), podem ocorrer reduções de dois a três ciclos logarítmicos na concentração de *Cryptosporidium* utilizando as etapas de coagulação, floculação e filtração da água. Contudo, se essas etapas de tratamento da água não forem realizadas de forma correta, é possível que os oocistos consigam passar por todas essas barreiras e que não sejam inativados durante a desinfecção da água. Sabe-se que oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes ao processo de cloração convencional da água (FRANCO, 2007).

A partir da presença de oocistos de *Cryptosporidium* que não foram removidos pelo processo de tratamento da água associados com os biofilmes presentes na tubulação do sistema de abastecimento, nota-se a necessidade de estudos sobre resistência e infectividade desses oocistos após a sua liberação do biofilme (BETANCOURT e ROSE, 2004).

1.7.1. Adesão bacteriana e formação de biofilmes

Para compreender as interações existentes entre células bacterianas aderidas em uma superfície de contato e oocistos de *Cryptosporidium*, é necessário um maior entendimento sobre o processo de adesão e formação de biofilmes.

O processo de adesão microbiana ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde se fixam e iniciam o crescimento. A liberação desses microrganismos pode trazer consequências indesejáveis à qualidade do alimento ou da água, como alteração destes e veiculação de patógenos (ZOTTOLA, 1997, ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

A adesão bacteriana depende das propriedades físico-químicas do material do substrato e da superfície da célula. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e superfície depende da composição química da superfície e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE, 2002). Propriedades da superfície da célula, como a presença de flagelo, pili, adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico e cápsula, influenciam na aderência (TRACHOO, 2003), a qual ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível.

O processo reversível de adesão de um organismo a uma superfície envolve a aproximação deste a superfície de forma aleatória ou através de mecanismos de

quimiotaxia e de mobilidade por meio de apêndices celulares. Quando o microrganismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre forças atrativas e repulsivas, como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de Van der Waals, entre outros geradas entre as duas superfícies. A repulsão entre duas superfícies pode ser ultrapassada por meio de interações moleculares específicas, mediadas por adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas que irradiam da superfície celular (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Durante a adesão reversível, as bactérias ainda exibem movimentos Brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de uma força mínima (WATNICK e KOLTER, 2000; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003). Após a adesão reversível, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeos que complexam os materiais da superfície e os receptores específicos localizados nos flagelos, pili ou fímbrias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. Durante este estágio de adesão, os microrganismos individualizados ou planctônicos podem “colar-se” uns aos outros, formando agregados na superfície a que aderem. Após a adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme (FRIEDMAN e KOLTER, 2004; KLAUSEN et al., 2003).

A remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil e requer aplicação de uma forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, desinfetantes e, ou, calor (SINDE e CARBALLO, 2000).

1.7.1.1. Fatores físico-químicos que afetam a formação de biofilmes

Alguns estudos têm descrito o fenômeno de adesão bacteriana e formação de biofilmes em termos de parâmetros físico-químicos tais como hidrofobicidade (JOSHUA et al., 2006), energia de superfície (BUSSCHER et al., 1984; GILBERT et al., 1991), e interações eletrostáticas das partículas celulares com as superfícies (BAYER et al., 1990; VAN LOOSDRECHT et al., 1987).

Segundo Gottenbos et al. (2002), bactérias movem-se ou são movidas para a superfície de um material devido aos efeitos de forças físico-químicas, como movimentos Brownianos, forças de atração de Van der Waals, forças gravitacionais, efeitos de cargas eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Algumas teorias têm sido

utilizadas para descrever a adesão bacteriana em superfícies. A teoria DLVO desenvolvida inicialmente por Derjaguin e Landau, em 1941, e complementada em 1948 por Verwey e Overbeek, sumariza as contribuições das forças de Van der Waals e eletrostáticas para a energia de interação interfacial entre duas superfícies e explica a adesão de microrganismos com base na interação entre partículas coloidais, desprezando todos os aspectos microbiológicos da adesão. Além disso, as forças de interação contabilizadas por esta teoria são apenas as forças de longo alcance, como as forças de Van der Waals e forças resultantes da dupla camada elétrica (OLIVEIRA et al., 2006).

Portanto, essa teoria só prevê a adesão inicial, a qual é reversível, mediada por forças de longo alcance, mas não permite quantificar a energia potencial dessa interação. Depois que uma partícula atinge a adesão inicial, um conjunto de forças de curto alcance passa a dominar a interação e a determinar as forças de adesão (CHAVES, 2004).

A teoria termodinâmica é a segunda abordagem físico-química que tem sido utilizada para descrever a adesão bacteriana às superfícies (MORRA e CASSINELLI, 1997). De acordo com essa teoria, para se estabelecer uma adesão efetiva entre duas superfícies em meio aquoso o filme de água que as separa tem que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies interatuantes contribui para a facilidade dessa remoção (CHAVES, 2004). Termodinamicamente, a energia livre permutada nesse fenômeno tende a ser minimizada e a adesão só se verifica se o processo conduzir a uma diminuição da energia livre global.

Em 1994, a teoria DLVO foi complementada por Van Oss e colaboradores, para justificar os desvios da mesma, englobando as forças de curto alcance, também designadas forças não DLVO (CHAVES, 2004). As forças de curto alcance englobam as forças de repulsão de Born, as forças de hidratação, as interações hidrofóbicas, as interações estéricas e as pontes poliméricas. Estas forças permitem justificar os desvios da teoria DLVO, contudo estes tipos de interações não são facilmente quantificáveis com a exceção das interações hidrofóbicas (ELIMELECH, 1995). A hidrofobicidade tem sido considerada a força de curto alcance mais importante na adesão bacteriana (VAN OSS, 1997; BUSSCHER et al., 1990).

Interações inespecíficas também contribuem para as etapas iniciais da adesão bacteriana, acompanhadas de interações mais específicas entre adesinas bacterianas e receptores teciduais (HAN-YIPING, 2000). Dentre essas forças inespecíficas,

destacam-se as forças hidrofóbicas, as quais apresentam papel relevante na adesão de microrganismos, tanto em superfícies inertes, quanto em superfícies de alimentos (DENYER et al., 1993).

A hidrofobicidade da superfície celular é baseada em compostos associados com a membrana externa incluindo lipopolissacarídeos, lipoproteínas e ácidos lipoteicóicos. A orientação destes compostos na membrana externa determina a hidrofobicidade da superfície celular. A maioria das bactérias Gram-negativas possuem longas regiões de polissacarídeos expostos oriundos de seus lipopolissacarídeos, resultando em superfície hidrofílica, enquanto que as bactérias Gram-positivas possuem porções lipídicas de ácidos lipoteicóicos estendidos para parte externa da célula, resultando em superfície hidrofóbica (TRACHOO, 2003). Contudo, a hidrofobicidade é a propriedade termodinâmica mais facilmente influenciada pela quantidade de água do meio, sendo assim, os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, dependendo do modo de crescimento bacteriano e das condições de cultura (KUMAR e ANAND, 1998).

Existem vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade de superfície, tais como: adesão a hidrocarbonetos, partição hidrofóbica em sistema aquoso bifásico, cromatografia de interação hidrofóbica, agregação por adição de sais – “salting out”, adesão a superfícies hidrofóbicas e medição de ângulos de contato. A medição de ângulos de contato é a técnica mais utilizada para determinar a hidrofobicidade de materiais (VAN OSS e GIESE, 1995).

O ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida é o ângulo resultante entre a linha tangente à interface que separa o líquido e o vapor e a linha paralela à superfície do sólido, como mostrado na Figura 1 (van LOOSDRECHT et al., 1987). Se o líquido for a água, o ângulo formado permite avaliar a molhabilidade da superfície e será relacionado a hidrofobicidade. Para ângulos de contato com a água inferiores a 65° a superfície será hidrofílica, enquanto que para ângulos de contato superiores a 65° a superfície é considerada hidrofóbica (VOGLER, 1998). Entretanto, outros autores como van Oss e Giese (1995), consideram uma superfície hidrofílica quando os ângulos de contato formados pela água sobre uma superfície são inferiores a 50° , para valores superiores trata-se de uma superfície hidrofóbica.

Os pesquisadores van Oss e Giese (1995) desenvolveram uma metodologia que permite quantificar a hidrofobicidade da superfície através das componentes da tensão

superficial. De acordo com o critério proposto por esses autores, a hidrofobicidade é definida em termos de variação da energia livre de interação entre as moléculas e uma superfície imersa em água (ΔG_{sws}^{TOT}). A superfície é considerada hidrofóbica, quando a variação da energia global de interação entre as moléculas da superfície é atrativa ($\Delta G_{sws}^{TOT} < 0$), o que significa que as moléculas da superfície possuem maior afinidade entre si do que com a água. Por outro lado, a superfície é considerada hidrofílica, quando a variação da energia livre global de interação entre as moléculas da superfície imersa em água é repulsiva ($\Delta G_{sws}^{TOT} > 0$). Dessa forma, quanto menor a energia livre global mais hidrofóbica é a superfície.



Figura 1 - Ângulo de contato (θ) entre uma gota de líquido e uma superfície plana e horizontal. As tensões superficiais da superfície do sólido γ_S , do líquido em equilíbrio com o vapor γ_{LV} e superfície/líquido γ_{SL} (van LOOSDRECHT et al., 1987).

1.7.2. Estratégias de controle da adesão e formação de biofilmes

Para que não haja adesão bacteriana e formação de biofilmes em qualquer sistema industrial ou de distribuição de água é preciso controlar a sua formação. Para isso, é necessário definir estratégias de caráter preventivo, onde se possa evitar ou retardar a formação de biofilmes.

Várias estratégias de controle de biofilmes podem ser implementadas dependendo da extensão do problema. Essas estratégias podem recorrer a métodos físicos, químicos e biológicos (ANDRADE, 2008).

Os métodos físicos envolvem técnicas de remoção física de biofilmes. Exemplos destes métodos são a limpeza manual, a aplicação de ultra-sons, a radiação ultravioleta, a injeção de ar ou gás e os choques térmicos (HAYES, 1995).

Quando as medidas preventivas e os métodos físicos não são suficientes para evitar a acumulação do biofilme e as suas consequências empregam-se, geralmente, os métodos químicos que envolvem a aplicação de compostos com capacidade de

remoção da massa de biofilme e inativação dos microrganismos que permanecem na superfície. Estes compostos são substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, dispersantes e, ou tensoativas, cujos mecanismos de ação passam pela fragilização da matriz polimérica dos biofilmes, pelo enfraquecimento das interações entre biofilme e superfície de adesão e pela dispersão de depósitos microbianos (BHAIRI e MOHAN, 2007).

Entre as várias estratégias de controle da contaminação microbiana encontra-se o uso de surfactantes, também conhecidos como tensoativos. Surfactante é uma abreviação de **SURFace ACTIVE Agents**, que significa “agente ativo de superfície”. Um surfactante é caracterizado pela sua tendência de adsorver em superfícies e interfaces (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

Os surfactantes têm sido usados no controle da adesão e formação de biofilmes em equipamentos industriais, especialmente na indústria alimentícia (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Os surfactantes são caracterizados pela sua capacidade de reduzir a tensão superficial dos fluidos aquosos. Esta característica permite-lhes atuar como substâncias detergentes, agentes umedecedores e emulsionantes. Podem ser definidos como moléculas com duas partes distintas: (i) a parte hidrofóbica, parte apolar que repele a água e (ii) a parte hidrofílica (parte polar que atrai a água) (ANDRADE, 2008). A parte hidrofílica é referente ao grupo da cabeça e a parte hidrofóbica à cauda (Figura 2).

A uma concentração baixa o surfactante é uniformemente distribuído, enquanto que se estiver em concentrações elevadas, o surfactante forma micelas. A concentração a partir da qual se inicia o processo de formação das micelas, ao qual se dá o nome de micelização é chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC) que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. A formação das micelas pode ser vista como um mecanismo alternativo à adsorção em interfaces, mediante o isolamento do contato com a água dos grupos hidrofóbicos, reduzindo-se, assim, a energia livre do sistema. É um fenômeno considerado de grande importância uma vez que as moléculas de surfactante se tornam muito diferentes quando presentes em micelas ou unidades livres em solução (RIZZATTI e ZANETTE, 2009).

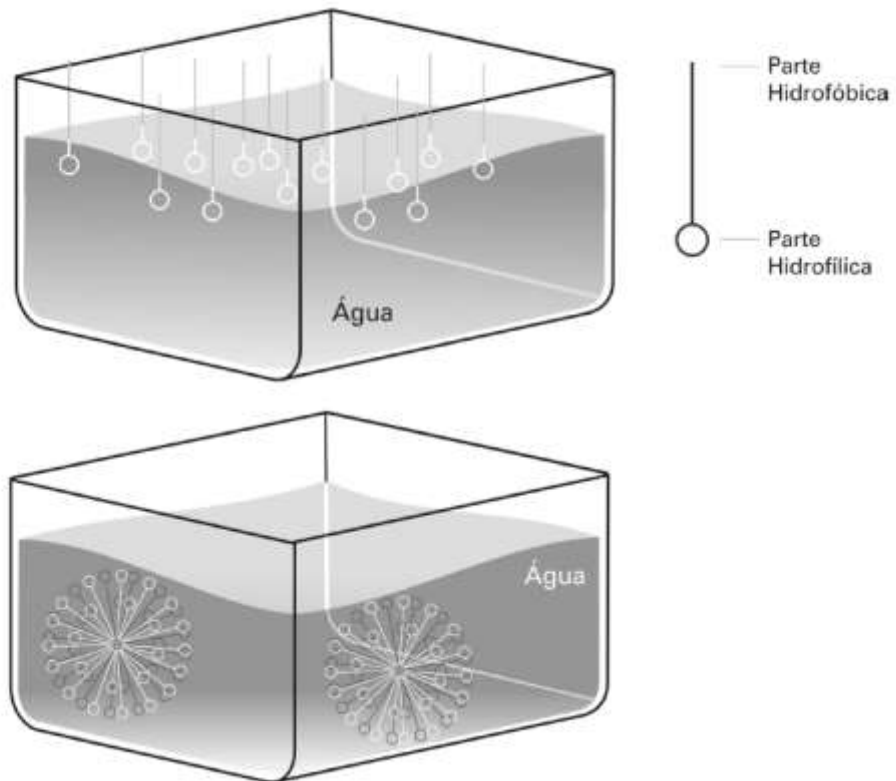


Figura 2 - Representação esquemática da interação do surfactante com a água. Fonte: ANDRADE (2008).

As micelas são esferas de agregados de moléculas caracterizadas por um núcleo hidrofóbico e uma superfície externa hidrofílica. Numa micela, o grupo hidrofílico encontra-se em contato com a água enquanto que a parte hidrofóbica encontra-se no interior da micela. Assim, quando um surfactante é adsorvido, em solução aquosa, a superfície hidrofóbica normalmente orienta o grupo hidrofóbico para a superfície e expõe o grupo polar à água (Figura 2). A superfície torna-se assim hidrofílica e, como resultado, a tensão interfacial entre a superfície e a água é reduzida (ANDRADE, 2008).

A classificação primária dos surfactantes é baseada na sua ionização em solução aquosa. Assim, são designados como aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros, conforme a carga elétrica liberada que pode ser um ânion, um cátion, não tenha carga ou contenha dois grupos de carga de diferente sinal, respectivamente (MULLIGAN et al., 2001).

Os surfactantes mais utilizados são os aniônicos e catiônicos. Ambos têm um papel na desinfecção, pois podem alterar as propriedades superficiais da superfície de adesão e inativar células vivas (MCDONNELL e RUSSELL, 1999). Por este motivo,

podem contribuir para promover o destacamento de células aderidas e prevenir o processo de adesão (CAMPBELL et al., 1999). Os surfactantes aniônicos reduzem a permeabilidade da parede celular e podem romper a membrana da célula microbiana. Os surfactantes catiônicos reagem quimicamente com a carga negativa dos íons associados à parede celular. A força eletrostática estabelecida entre o produto químico e a célula cria um estresse na parede levando à lise celular e, conseqüentemente, danos à membrana pela reação com os fosfolípidios que a compõe, podendo causar a morte da célula. São exemplos de surfactantes aniônicos e catiônicos, o dodecil sulfato de sódio e os compostos quaternários de amônio, respectivamente (LUTEY, 1995).

Os compostos quaternários de amônio representam o grupo dos surfactantes catiônicos e manifestam, normalmente, atividade antimicrobiana. Esses compostos causam a morte celular por desnaturação das proteínas, alterando a permeabilidade da parede celular e reduzindo a entrada normal de nutrientes na célula. Conseqüentemente, há liberação de K^+ intracelular e de outros constituintes intracelulares e induzindo-se a autólise celular (MCDONNELL e RUSSELL, 1999; ISHAKAWA et al., 2002; TABATA et al, 2003).

O cloreto de benzalcônio é um dos tipos de compostos quaternários de amônio, constituído por uma mistura de compostos de alquil benzil dimetil amônio. Esse composto tem sido utilizado como um agente antimicrobiano e surfactante na indústria, em produtos de higienização, preparações farmacêuticas e produtos de consumo. Devido à sua grande capacidade de desinfecção, a concentração de uso é, normalmente, menor que 1%, sendo, especialmente, eficaz entre pH 6 e 8 (GARDNER et al. 2000).

A natureza surfactante destes compostos dificulta a análise devido à agregação dos compostos e à formação de micelas. O seu largo espectro de atividade antimicrobiana cobre bactérias, leveduras, fungos, algas e organismos formadores de biofilme. Como composto ativo nas superfícies, o cloreto de benzalcônio, quando usado em concentrações de 1 a 2%, reduz a tensão superficial da água, causa um bom umedecimento e penetração em profundidade estando, portanto, garantidas condições para ser utilizado como agente de pré-tratamento de superfícies. O cloreto de benzalcônio pode ser usado como um ingrediente ativo em sanitizantes (GARDNER et al., 2000).

Os surfactantes não iônicos da série Tween apresentam emprego variado. Tween é o nome comercial dado aos surfactantes derivados do polioxietileno sorbitol, onde o número de grupos de polioxietileno é constante, variando a composição da cadeia de hidrocarbonetos. Dentro dessa série, podem ser encontrados Tween 20, Tween 40 e Tween 80, derivados dos ácidos láurico, palmítico e oléico, respectivamente (BHAIRI e MOHAN, 2007). As interações moleculares entre surfactantes não iônicos com a camada lipídica da membrana celular podem ser as responsáveis pelo efeito dessa classe de surfactante sobre as células bacterianas. A troca de monômeros entre o surfactante e os fosfolipídios justifica a extração indireta de proteínas das membranas, DNA e rompimento da membrana celular (CUMMINS e EKEZE, 1997; MOLLOY et al., 1998; BHAIRI e MOHAN, 2007). Assim, o conhecimento da interação dos surfactantes com membranas biológicas é importante para definir as possíveis aplicações desses produtos químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Principais síndromes infecciosas.** Módulo 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_1_2004.pdf> Acesso em: 01 mar 2009.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo: Varela, 412 p., 2008.

ANGLES, M. L.; CHANDY, J. P.; COX, P. T.; FISHER, I. H.; WARNECKE, M. R. Implications of biofilm-associated waterborne *Cryptosporidium* oocysts for the water industry. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 352-356, 2007.

BARNARD, R. J.; JACKSON, G. J. *Giardia lamblia*: The transfer of human infections by foods. In: **Giardia and giardiasis: Biology, pathogenesis, and epidemiology**, ed. Erlandsen, S. L., Meyer, E. A. p. 365-378. New York: Plenum.

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

BAYER, M. E.; SLOYER, J. L. The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 867-874, 1990.

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*: waterborne zoonotic parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 219-234, 2004.

BEUCHAT, L. R. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 204-216, 1995.

BHAIRI, S. M.; MOHAN, C. **Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry.** Detergents Booklet - EMD Biosciences, 43p., 2007. Disponível em: <

http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/LIT/CB0068_E.pdf> Acesso em: 03 Set. 2009.

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

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

BRANCO JÚNIOR, C.; RODRIGUES, J. C. Importância dos aspectos sanitários e educacionais na epidemiologia de enteroparasitoses em ambientes rurais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 31, p. 87-89, 1999.

BRASIL - Ministério da Saúde. Portaria nº 518, DE 25 DE MARÇO DE 2004. **Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 16 mai. 2009.

BUSSCHER, H. J.; SJOLLEMA, J.; VAN DER MEI, H. Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to surfaces. In: DOYLE, R. J.; ROSENBERG, M. (Eds). **Microbial cell surface hydrophobicity**. American Society of Microbiology, Washington, D. C., 401 p.1990.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, H. C.; VAN DER MEI, A. W. J.; VAN PELT, H. P. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 980-983, 1984.

CAMPBELL, P.; SRINIVASAN, R.; KNOELL, T.; PHIPPS, D.; ISHIDA, K.; SAFARIK, T.; CORMACK, H.; RIDWAY, H. Quantitative structure-activity relation (QSAR) analysis of surfactants influencing attachment of a *Mycobacterium* sp. to cellulose acetate and aromatic polyamide reverse osmosis membrane. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 527-544, 1999.

CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H.; BETTINI, M. J. C. B.; MANGINI, A. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP- Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 89-91, 2001.

CAREY, C. M.; LEC, H.; TREVEORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, p. 818-862, 2004.

CARPENTER, C.; FAYER, R.; TROUT, J.; BEACH, M. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 579-584, 1999.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Annual listing of foodborne disease outbreaks, United States, 1990-2004**. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak_data.htm> Acesso em: 06 set. 2009.

CEBALLOS, B. S. O.; DINIZ, C. R.; WATANABE, T.; MISHINA, S. V. **Viabilidade da qualidade das águas de açudes nordestinos**. Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária - ABEAS, p. 2080-2093, 1997.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: CHARACKLIS, W.G; MARSHALL, K.C. (Ed.). **Biofilms**. John Wiley & Sons, New York. p. 3-15,1990.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. Universidade do Minho, 2004. 156 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Portugal, 2004.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Institute of Food Technologists**, v. 2, p. 22-32, 2003.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D. S. Avaliação da relação entre parasitoses intestinais e fatores de risco para o HIV em pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 181-185, 1999.

CLANCY, J. L.; BUKHARI, Z.; HARGY, T. M.; BOLTON, J. R.; DUSSERT, B. W.; MARSHALL, M. M. Using UV to inactive *Cryptosporidium*. **Journal American Water Works Association**, v. 92, p. 97-104, 2000.

COULTER, J. B. S. Global importance of parasitic disease. **Current Paediatrics**, v.12, p.523-533, 2002.

CRAUN, G. F. Surface water supplies and health. **Journal of the American Water Works Association**, v. 80, p. 40-52, 1988.

CRAUN, G. F. Waterborne giardiasis in the United States: a review. **American Journal of Public Health**, v. 69, p. 817-819, 1979.

CUMMINS, T. J.; EKEZE, T. Methods of extracting deoxyribonucleic acids without using a protelytic enzyme. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 389-393, 1997.

DAROLT, M. R. **A qualidade dos alimentos orgânicos**. Conferência BioFach, Rio de Janeiro, set. 2003. Disponível em: < <http://www.planetaorganico.com.br.html> >. Acesso em: 11 jun. 2009.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. O. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847-867, 2000.

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 207-227, 2005.

DAWSON, D. J.; SAMUEL, C. M.; SCRANNAGE, V.; ATHERTON, C. J. Survival of *Cryptosporidium* species in environments relevant to foods and beverages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1222-1229, 2004.

DENG, M. Q.; CLIVER, D. O. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 113-121, 1999.

DENYER, S. P.; GORMAN, S. P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control**. Blackwell Scientific Publications, 333 p. 1993.

DI BENEDETTO, M. A.; CANNOVA, L.; DI PIAZZA, F.; AMODIO, E.; BONO, F.; CERAME, G.; ROMANO, N. Hygienic sanitary quality of ready-to-eat salad vegetables on sale in the city of Palermo (Sicily). **Igiene Sanità Pubblica**, v. 63, p. 659-670, 2007.

DINIZ, C. R. **Aspectos sanitários de corpos lênticos temporários utilizados para consumo humano**. Universidade Federal da Paraíba, 1994. 143 p. Dissertação (Mestrado em Gestão e Controle Ambiental) – Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1994.

DZIUBAN, E. J.; LIANG, J. L.; CRAUN, G. F. et al. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water - United States, 2003 - 2004. **MMWR Surveillance Summaries - CDC**, v. 55, p. 1-30, 2006.

ELIMELECH, M.; GREGORY, J.; JIA, X.; WILLIAMS, R. **Particle Deposition and Aggregation-Measurements, Modelling and Simulation**. Colloid and Surface Engineering Series, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, 441 p., 1995.

ERCOLE, C.; DEL GALLO, M.; MOSIELLO, L.; BACCELLA, S.; LEPIDI, A. *Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 91, p. 163-168, 2003.

FACILE, N.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M.; KOUDJOUNOU, B. Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* inactivation by ozone. **Water Research**, v. 34, p. 3238-3246, 2000.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The application of risks analysis in food control – challenges and benefits**. Regional Conference on Food Safety for Ásia and Pacific. Seremban, Malaysia, 2004a.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Food safety legislation; the use of science and risk-based approaches to harmonization**. Regional Conference on Food Safety for Ásia and Pacific. Seremban, Malaysia, 2004b.

FAYER, R. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2732-2735, 1994.

FAYER, R., DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 531-536, 2004.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R.; NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1431-1433, 1996.

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In FAYER, R. (Ed.), **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1-41, 1997.

FERREIRA, P.; RIBEIRO, M.; BATISTA, F. Ocorrência de parasitas e comensais intestinais em crianças de escola localizada em assentamento de sem-terras em Campo Florido, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 109-111, 2003.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, p. 36-43, 2007.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 109-111, 2001.

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

FRIEDMAN, D. E.; PATTEN, K. A.; ROSE, J. B.; BARNEY, M. C. The potencial for *C. parvum* oocyst survival in beverages associated with contaminated tap water. **Journal of Food Safety**, v. 17, p. 125-132, 1997.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 675-690, 2004.

GAMBA, R. C.; CIAPINA, E. M.; ESPINDOLA, R. S.; PACHECO, A.; PELIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 151-153, 2000.

GARDNER, W. P.; GIRARD, J. E. Analysis of Common Household Cleaner-Disinfectants by Capillary Electrophoresis. **Journal of Chemical Education**. v. 10, p. 1335-1338, 2000.

GILBERT, P.; EVANS, D. J.; EVANS, E.; DUGUID, L. G.; BROWN, M. R. W. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 71, p. 72-77, 1991.

GOMES, A. H. S.; PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; CESAR, N. P. A.; DIAS, H. G. G.; SILVA, R. P. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, p. 59-63, 2002.

GOTTENBOS, B.; BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C.; NIEUWENHUIS, P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, p. 717-722, 2002.

GRILLO, L. P.; CARVALHO, L. R.; SILVA, A. C.; VERRESCHI, I. T. N.; SAWAYA, A. L. Influência das condições sócio-econômicas nas alterações nutricionais e na taxa de metabolismo de repouso em crianças escolares moradoras em favelas do município de São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 7-14, 2000.

GUILHERME A. L.; ARAÚJO, S. M.; FALAVIGNA, D. L. M.; PUPULIM, A. R. T.; DIAS, M. L. G. G.; OLIVEIRA, S.; MAROCO, E.; FUKUSHIGUE, Y. Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da feira do produtor de Maringá, Paraná. Maringá. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 405-411, 1999.

GUIMARÃES, A. M.; ALVES, E. G. L.; FIGUEIREDO, H. C. P.; COSTA, G. M.; RODRIGUES, L. S. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 1-5, 2003.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HAN-YIPING, W.; SHI, W.; HUANG, G. T. J.; HAAKE, S. K.; PARK, N. H.; KURAMITSU, H.; GENCO, R. J. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3140-3146, 2000.

HARP, J. A.; FAYER, R.; PESCH, B. A.; JACKSON, G. J. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2866-2868, 1996.

HAYES, P. R. **Food microbiology and hygiene**. 2nd ed. London, 515 p., 1995.

HAYES, S. L.; RICE, E. W.; WARE, M. W.; SCHAEFER, F. W. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 54-59, 2003.

HELLER, L.; BASTOS, R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M.; BEVILACQUA, P. D.; BRITO, L. L. A.; MOTA, S. M. M.; OLIVEIRA, A. A.; MACHADO, P. M.; SALVADOR, D. P.; CARDOSO, A. B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, p. 79-92, 2004.

HOORNSTRA, E.; HARTOG, B. A quantitative risk assessment on *Cryptosporidium* in food and water. 2003. In: **Teagasc Irish Agriculture and Food Development Authority**. Disponível em: <<http://www.teagasc.ie/publications/2003/>>

ISHIKAWA, S.; MATSUMURA, Y.; YOSHIZAKO, F.; TSUCHIDO, T. Characterization of a cationic surfactant-resistant mutant isolated spontaneously from *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 261-268, 2002.

ISSAC-MARQUEZ, A. P.; LEZAMA-DÁVILA, C. M.; KU-PECH, P. P.; TAMAY-SEGOVIA, P. Calidad sanitaria de los suministros de água para consumo humano em Campeche. **Salud Publica**, v.36, p. 55-61, 1994.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução Eduardo Cesar Tondo. Porto Alegre: Artmed, 711 p., 2005.

JOSHUA, G. W. P.; GUTHRIE-IRONS, C.; KARLYSHEV, A. V.; WREN, B. W. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v. 152, p. 387-396, 2006.

KANJO, Y.; KIMATA, I.; ISEKI, M.; MIYANAGA, S.; OKADA, H.; BANNO, C.; MATSUMOTO, M.; SHIMADA, Y. Inactivation of *Cryptosporidium* spp. Oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated y in vitro encystations and animal infectivity. **Water Science and Technology**, v. 41, p. 119-125, 2000.

KATZ, D.E.; HEISEY-GROVE, D.; BEACH, M. J.; DICKER, R. C.; MATYAS, B. T. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. **Epidemiology and Infection**, v.134, p. 935-941, 2006.

KLAUSEN, M.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLINS, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 61-68, 2003.

KEEVIL, C. W. Chemostat models of human and aquatic corrosive biofilms. In: HATTORI, T.; ISHIDA, Y.; MARUYAMA, Y.; MORITA, R. Y.; UCHIDA, A. (Ed.). **Recent Advances in Microbial Ecology**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, p. 151-156, 1989.

KING, B. J.; HOEFEL, D.; DAMINATO, D. P.; FANOK, S.; MONIS, P. T. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1311-1323, 2008.

KIRKPATRICK, C. E.; BENSON, C. E. Presence of *Giardia* spp. and absence of *Salmonella* spp. in New Jersey muskrats (*Ondatra zibethicus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1790-1792, 1987.

KNIEL, K. E.; SUMNER, S. S.; LINDSAY, D. S.; HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D.; ZAJAC, A. M.; GOLDEN, D. A.; FAYER, R. Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1650-1657, 2003.

- KOUBA, M. Quality of organic animal products. **Livestock Production Science**, v. 80, p. 33-40, 2003.
- KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.
- LECHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2.610-2.616, 1991.
- LEE, M. B. The effectiveness of commercially available disinfectants upon *Giardia lamblia* cysts. **Canadian Journal of Public Health**, v. 83, p. 171-172, 1992.
- LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 8, p. 791-800, 2003.
- LOPEZ, C. E.; JURANEK, D. D.; SINCLAIR, S. P. Giardiasis in American travelers to Madeira Island, Portugal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 1128-1132, 1978.
- LUDWIG, K.M.; FREI, F, ALVARES, F. F; PAES, J. T. R. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 547-555, 1999.
- LUTEY, R. W. Process cooling water. In: ROSSMOORE, H. W. **Hand book of biocides and preservative**. London. Blackie Academic and Professional, p. 50-82, 1995.
- MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-179, 1999.
- MAHBUBANI, M. H.; BEJ, A. K.; PERLIN, M.; SCHAEFER, F. W.; JAKUBOWSKI, W.; ATLAS, R. M. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live form dead cysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3456-3461, 1991.
- MANZI, R. M.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A. Diagnóstico laboratorial dos protozoários entéricos oportunistas em Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 597-598, 2000.
- MARZOCHI, M. C. A. Estudos dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas: estudo da contaminação de verduras e solo de hortas na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.19, p.148-155, 1977.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S. SHAPIRO, C. GRIFFIN, P. M. TAUXE, R. V. Food related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**. Atlanta, v. 5, p. 5-8, 1999. Disponível em <<http://www.cdc.gov.ncidod/eid/vol5n°5/meadG.htm>> Acesso em: 15 jun 2008.

MEDEMA, G. J.; SCHETS, F. M.; TEUNIS, P. F. M.; HAVELAAR, H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4460-4466, 1998.

MILLAR, B. C.; FINN, M.; XIAO, L.; LOWERY, C. J.; DOOLEY, J. S. G.; MOORE, J. E. *Cryptosporidium* in foodstuffs – an emerging aetiological route of human foodborne illness. **Trends in Food & Technology**, v. 13, p. 168-187, 2002.

MILLARD, P. S.; GENSHEIMER, K. F.; ADDISS, D. G.; SOSIN, D. M.; BECHETT, G. A.; HOUSK-JAOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 592-596, 1994.

MINTZ, E. D.; HUDSON-WRAGG, M.; MSHAR, P.; CARTTER, M. L.; HADLER, J. L. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 250-253, 1993.

MIRANDA, R.A.; XAVIER, F.B.; MENEZES, R.C. Parasitismo intestinal em uma aldeia indígena Parakanã, sudoeste do Estado do Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, p. 507-511, 1998.

MOLLOY, M. P.; HEBERT, B. R.; WALSH, B. J.; TYLER, M. L. TRAINI, M.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L.; GOOLEY, A. A. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 837-844, 1998.

MONGE, R.; CHINCHILLA, M. Presence of *Cryptosporidium* Oocysts in Fresh Vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 202-203, 1995.

MORAES, R. G.; LEITE, S. C.; GOULART, E. G. **Parasitologia e micologia humana**. 3.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 559p., 1984.

MORRA, M.; CASSINELLI, C. Bacterial adhesion to polymer surfaces: A critical review of surface thermodynamic approaches. **Journal of Biomaterials Science**, v. 9, p. 55-74, 1997.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380. 2001.

MUNIZ, R.C.; QUEIROZ, M.I. Relação entre desnutrição energético-protéica, vitamina A, e parasitoses em crianças vivendo em Brasília. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 133-142, 2002.

NETO, R. C.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 52-59, 2004.

NICHOLSON, F. A. A study on farm manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of pathogen transfer into the food chain. **Alternative Agriculture**, v. 37, p. 10-13, 2000.

OLIVEIRA, A. A. **Enteroparasitas em populações usuárias de diferentes sistemas de abastecimento de água em Viçosa – MG**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 112 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Comparison of the adhesion ability of different Salmonella Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2352-2356, 2006.

O'REILLY, C. E.; BOWEN, A.B.; PEREZ, N. E. et al. Outbreak Working Group. A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004. **Clinical Infectious Disease**, v. 44, p. 506-512, 2007.

ORTEGA, Y. R.; ROXAS, C. R.; GILMAN, R. H.; MILLER, N. J.; CABRERA, L.; TAQUIRI, C.; STERLING, C. R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Ciclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets pandemic region on Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 683-686, 1997.

OSTERHOLM, M. T.; FORFANG, J. C.; RISTINEN, T. L. An outbreak of foodborne giardiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 304, p. 24-28, 1981.

OWENS, J. H.; MILTNER, R. J.; RICE, E. W.; JOHNSON, C. H.; DAHLING, D. R.; SCHAEFER, F. W.; SHUKAIRY, H. M. Pilot-scale ozone inactivation of *Cryptosporidium* and other microorganisms in natural water. **Journal of Science Engineering**, v. 22, p. 501-517, 2000.

PACHECO, M. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CÂNDIDO, V. L. P.; GOMES, A; H. S.; ARMELIN, I. M.; BERNARDES, R. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializadas no Ceagesp de Sorocaba–SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, p. 50-51, 2002.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 872p.,1988.

PETERSEN, L. R.; CARTTER, M. L.; HADLER, J. L. A foodborne outbreak of *Giardia lamblia*. **Journal of Infectious Diseases**, v.157, p. 846-848, 1988.

PORTER, J. D.; GAFFNEY, C.; HEYMANN, D.; PARKIN, W. Foodborne outbreak of *Giardia lamblia*. **American Journal of Public Health**, v. 80, p. 1259-1260, 1990.

PRADO, M. S.; BARRETO, M.L.; SFRINA, A.; FARIA, J. A. S.; NOBRE, A. A.; JESUS, S. R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na Cidade de Salvador (Bahia, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 99-101, 2001.

RADZIMINSKI, C.; BALLANTYNE, L.; HODSON, J. Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: a bench-scale and pilot-scale study. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1629-1639, 2002.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R. Determinação da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Química Nova**, v. 32, p. 518-521, 2009.

ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3494-3500, 1992.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. **Journal of Food Protection**, v.64, p.1793-1798, 2001.

ROCHA, C. M. B. M.; RODRIGUES, L. S.; COSTA, C. C.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, I. J.; DE JESUS, E. F.; GOMES, E. **Avaliação da relação entre os tipos de mananciais e a qualidade de água utilizada na zona rural do município de Lavras-MG**. Anais do V Congresso Brasileiro de Epidemiologia, Sociedade Brasileira de Epidemiologia, SBE, p. 458, 2002.

ROSE, J. B.; LISLE, J. T.; LECHEVALLIER, M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence outbreaks, and treatment strategies. In FAYER, R. (Ed.), **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 93-110, 1997.

SALDIVA, S. R.; SILVEIRA, A. S.; PHILLIPI, S. T. *Ascaris-Trichuris* association and malnutrition in Brazilian children. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v.13, p. 89-98, 1999.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relation with pathogens and conventional indicator, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, v. 40, p. 2463-2476, 2006.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, p.203-208, 2006.

SCHIJVEN, J. F.; BRUIN, H. A. M.; HASSANIZADEH, S. M.; HUSMAN, A. M. R. Bacteriophages and *Clostridium* spores as indicator organisms for removal of pathogens by passage through saturated dune sand. **Water Research**, v. 37, p. 2186-2194, 2002.

SCHLUNDT, J.; TOYOFUKU, H.; JANSEN, J.; HERBST, S. A. Emerging foodborne zoonoses. **Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Epizooties**, v. 23, p. 513-533, 2004.

SHEPHERD, K. M.; WIN-JONES, A. P. Na evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1.317-1322, 1996.

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

SILVA, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 5 ed. São Paulo: Varela, 1995.

SILVA, E. F.; GOMES, M. A. Amebíase: *Entamoeba histolytica/Entamoeba díspar*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, p. 114-124, 2003.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p. 439-447, 2000.

SMITH, H. V. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology Today**, v. 117, p. 113-141, 1998.

SMITH, H. V.; GRIMASON, A. M. *Giardia* and *Cryptosporidium*. In: **The handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Ed. MARA, D., HORAN, N. J. Academic Press, p. 696-755, 2003.

SMITH, J. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.451-461, 1993.

SOGAYAR, M. I. T. L.; GUIMARÃES, S. *Giardia lamblia*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 107-113.

SOUTO, R. A. **Avaliação sanitária da água de irrigação e de alfaces (*Lactuca sativa* L.) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba**. Areia, PB: UFPB, 2005. 58 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal da Paraíba, 2005.

TABATA, A.; NAGAMUNE, H.; MAEDA, T.; MURAKAMI, K.; MIYAKE, Y.; KOURAI, H. Correlation between Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membrane Protein OprR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, p. 2093-2099, 2003.

TAKAYANAGUI, O. M.; SILVA, A. A. M. C.; SANTIAGO, R. C.; ODASHIMA, N. S.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Notificação compulsória da cisticercose em Ribeirão Preto-SP. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 54, p. 557-564, 1996.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A. P.; WATT, S. E.; DOWD, R.; ENRIQUEZ, I. L.; PEPPER, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.378-382, 2002.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Journal of Science Technology**, v. 25, p. 807-815, 2003.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1047-1058, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Cryptosporidium: human health criteria document**. Washington: Office of Science and Technology, 2001. 141 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Giardia: human health criteria document**. Washington: Office of Science and Technology, 128 p., 1998.

VALCARCE, M. B.; BUSALMEN, S. R.; SÁNCHEZ, S. R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 50, p. 61-66, 2002.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J. B. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1893-1897, 1987.

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity and Hydrophilicity of biosurfactans. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 2, 503-512, 1997.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hidrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v.74, p. 69-117, 1998.

WANDERLEY, A.A.S.; DE ANDRADE, G.V.; SILVA, E.M.A. A ocorrência de enteroparasitoses na população do município de Maxaranguape/RN. **Revista NewsLab**, v. 42, p. 180-192, 2000.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. 2004. **About microbiological risk assessment (MRA) in food**. Disponível em <http://.who.int/foodsafety/micro/about_mra/en/index.html> Acesso em: 01 jun 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2004. **Guidelines for drinking water quality**. (Third Edition). World Health Organization, Geneva, ISBN:92 4 154638 7. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/waterforhealth>. Acesso em: 20 nov 2008.

ZOTTOLA, E. A. Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: TORTORELLO, M. L; GENDEL, S. M. **Food microbial analysis – new technologies**. IFT Basic Symposium Series. Marcell Dekker, INC, Cap. 16, p. 315-346, 1997.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.

CAPÍTULO 2

***Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.: OCORRÊNCIA EM ALFACE, SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS DE QUALIDADE DE PRODUÇÃO E CONTROLE POR PROCEDIMENTOS DE HIGIENIZAÇÃO**

1. INTRODUÇÃO

A cada dia o homem tem modificado intensamente o ambiente em que vive com a finalidade de aumentar a produção e a qualidade dos alimentos, porém essas mudanças têm causado sérios impactos negativos ao ambiente, que refletem na saúde das populações (COULTER, 2002).

Independentemente do sistema de cultivo, o consumo de vegetais *in natura* tem recebido, cada vez mais, preferência na dieta humana. Entretanto, a busca por uma alimentação mais saudável pode constituir um importante meio de veiculação de várias doenças infecciosas, em razão das condições em que o produto é exposto durante o período de produção e distribuição (SIVAPLASINGHAM et al., 2004). Dentre esses alimentos, as hortaliças folhosas destacam-se como um dos veículos de contaminação mais importantes, principalmente aquelas que apresentam folhas sobrepostas e de superfície irregular, pois essas oferecem condições mais favoráveis para retenção e sobrevivência dos organismos (SANTANA et al., 2006).

A microbiota de alimentos de origem vegetal depende de diversos fatores que vão desde etapas de produção primária até o seu preparo para o consumo final. Uma fonte primária de contaminação de hortaliças é a água de irrigação que pode apresentar uma grande concentração de contaminantes como bactérias, cistos de

Giardia, oocistos de *Cryptosporidium*, ovos de helmintos, entre outros, quando associada a descargas de esgotos ou até mesmo à presença de animais que se alimentam e pastam próximo a essas áreas. O solo e o adubo orgânico parecem ser responsáveis também por grande parte das contaminações, seguidos de condições impróprias de lavagem e estocagem (NEVES et al., 2003).

A Organização Mundial da Saúde tem sugerido o estudo de análise quantitativa de risco relacionado à presença de protozoários em vegetais. A qualidade e segurança microbiológica desses alimentos podem também ser comprometidas por manipulação incorreta e utilização de equipamentos não sanitizados que contribuem para o aumento das populações microbianas e contaminação cruzada por microrganismos patogênicos. Procedimentos de corte e retirada das folhas podem levar ao aumento do número de microrganismos e a redução da vida útil desses vegetais (HEATON e JONES, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as indústrias que comercializam produtos de higienização têm procurado alternativas para aumentar a segurança microbiológica de hortaliças folhosas consumidas cruas, como é o caso da alface. Dentre essas alternativas, encontram-se a introdução de uma etapa de uso de agentes detergentes e o aumento da eficiência dos sanitizantes. O emprego de surfactantes tem sido a alternativa mais aplicada para uso como detergentes para hortaliças, embora nenhum dos produtos dessa natureza tenha sido aprovado com esse fim pela legislação brasileira. Isso demonstra a necessidade de mais estudos para que o uso de surfactantes como detergentes possa ser aplicado no controle microbiológico de hortaliças folhosas ingeridas cruas.

A escolha da alface como a hortaliça a ser analisada nesse trabalho foi realizada levando-se em consideração os seguintes fatores: i) Grande aceitação e o alto consumo por parte da população; ii) Grande produção e comercialização no município de Viçosa/MG; iii) É uma hortaliça que permanece sempre em contato com o solo e cujas folhas constituem a parte comestível, apresentando-se sobrepostas, o que propicia condições para a retenção e a sobrevivência de microrganismos nelas depositados; iv) Disponibilidade durante, praticamente, todos os meses do ano; e v) Forma de consumo, geralmente ingerida sem cocção prévia.

Diante do exposto, esse estudo tem como justificativa subsidiar os órgãos de saúde pública no controle de surtos causados por protozoários por meio da quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em fontes de contaminação presentes em hortas produtoras de alface.

2. OBJETIVOS

- Identificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em hortas da cidade de Viçosa, MG, em alface, água de irrigação, solo e adubo;
- Verificar a possível influência das variações climáticas sobre a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. em alface, água de irrigação, solo e adubo, mediante a comparação do número de (oo)cistos nas estações: seca e chuvosa, durante o período de 10 meses;
- Avaliar diferentes parâmetros de qualidade na produção de alface: (i) físico-químico: turbidez da água de irrigação e (ii) microbiológicos: coliformes a 35 °C, *Escherichia coli*, esporos de bactérias anaeróbias e *Clostridium perfringens*, esporos de bactérias aeróbias, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de irrigação, alface, adubo e solo;
- Desenvolver estudos de correlação entre a presença de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. com os diferentes parâmetros físico-químico e microbiológicos de qualidade na produção de alface;
- Testar procedimentos de higienização utilizando surfactantes para avaliar a remoção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* aderidos à alface em cultura pura e em cultura mista com *Pseudomonas fluorescens*, por meio de testes do desafio microbiológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, UFV.

3.1. Parâmetros de qualidade na produção de alface

Nesse estudo, foram utilizados como material de investigação amostras de água de irrigação, alface, solo e adubo orgânico coletados em cinco hortas, cujos produtos são fornecidos para o comércio de Viçosa, MG. As hortas de alface, denominadas de unidades produtoras, foram selecionadas com base na fonte de abastecimento de água que era utilizada para a irrigação das hortaliças pelo sistema de aspersão. Neste trabalho, as unidades produtoras (UP) de alface, foram identificadas como UP1, UP2, UP3, UP4 e UP5, as quais utilizavam, respectivamente, águas provenientes de: poço semi-artesiano, mina, nascente, córrego e poço artesiano.

A qualidade da hortaliça no processo produtivo foi avaliada nos períodos de seca (maio de 2008 a setembro de 2008) e de águas (outubro de 2008 a fevereiro de 2009). Foram realizadas análises de determinação de protozoários e de bactérias em água de irrigação, alface, adubo e solo. A análise de turbidez foi realizada nas amostras de água. Os dados de pluviosidade foram obtidos na Estação Meteorológica da UFV.

3.2. Análises realizadas em água de irrigação

3.2.1. Pesquisa quantitativa de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp.

Foi coletado um volume de 2 L de água em galão de plástico que foi previamente sanitizado com solução de hipoclorito de sódio a 12,5%, enxaguado com solução de tiosulfato de sódio a 52% e água destilada esterilizada segundo Ferguson et al. (1996).

Para avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. em água de irrigação foi empregado o procedimento de filtração em membrana para análise da presença de protozoários em água, conforme descrito por Franco et al. (2001a).

Inicialmente, o volume coletado foi filtrado em membrana de ésteres de celulose (Millipore®) com porosidade nominal de 1,2 µm, para água de poço, mina e nascente ou de 3,0 µm, para água do córrego ou para água de poço, mina e nascente quando apresentavam alto grau de turbidez, com o auxílio de bomba de vácuo (Millipore®) com ajuste no fluxo para 4 L.min⁻¹. Após a filtração, a membrana foi retirada com auxílio de pinça previamente esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 min e colocada em uma miniplaca descartável de 48 mm de diâmetro. Os (oo)cistos eventualmente presentes nas amostras foram recuperados da membrana mediante extração mecânica por meio de raspagem da superfície da membrana com alças plásticas durante 10 min e lavagem com solução de eluição de Tween 80 a 0,01% por duas vezes consecutivas. Todo o líquido resultante dessa etapa foi recolhido em um tubo de centrifuga, até que o volume de 12 a 15 mL fosse atingido. A centrifugo-concentração foi realizada a 1050 x g por 15 min. Com o auxílio de pipeta de *Pasteur*, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente até a graduação de 900 µL, de modo a manter o sedimento intacto. Esse material foi agitado em vórtex por 3 min e imediatamente transferido para um tubo com tampa apegada (Eppendorf®), onde foram adicionados 100 µL de solução de formalina a 5%, mantendo-se um volume final de 1000 µL. Dessa forma, o material concentrado que foi acondicionado no tubo com tampa apegada foi armazenado a 6 °C ± 1 °C, até o momento de enumeração dos (oo)cistos.

Para controle de qualidade dessa análise, alguns cuidados foram tomados. Após a filtração da amostra a ser concentrada, foi adicionado 1 L de solução de eluição ao galão de coleta e realizou-se agitação por 20 vezes. Esse fluido foi filtrado em uma

membrana separadamente e analisado isoladamente da mesma forma como foi realizado com a amostra de água. O resultado dessa análise deveria ser sempre negativo, caso contrário, poderia ocorrer perda de (oo)cistos por adesão ao recipiente usado para coleta.

3.2.1.1. Visualização e quantificação de (oo)cistos

Para a quantificação dos (oo)cistos em amostras de água foi utilizado o *kit* diagnóstico *Merifluor*[®] (*Meridian Bioscience, Inc.*) que se baseia na técnica de imunofluorescência direta *in vitro* para detecção simultânea de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na amostra, conferindo uma fluorescência típica aos (oo)cistos pesquisados. O reagente de detecção do *kit* Merifluor[®] contém uma mistura de anticorpos monoclonais marcada com isotiocianato de fluoresceína direcionados contra os antígenos da parede celular de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., cuja diferenciação se dá por aspectos morfológicos e por tamanhos: cistos de *Giardia* spp. apresentam 8 a 12 µm e oocistos de *Cryptosporidium* spp. 4 a 6 µm. A sensibilidade do *kit* varia de 97 % a 100 % e a especificidade de 94 % a 100% para *Cryptosporidium* spp. e para *Giardia* spp., ambas são de 100% (*MeriFluor*[®] Cryptosporidium/Giardia, 2004).

Os procedimentos adotados seguiram as recomendações do fabricante. Para realização da técnica foram utilizadas alíquotas de 10 µL de cada amostra concentrada. As lâminas preparadas foram observadas sob microscopia de epifluorescência (Microscópio Leica DC 300F) sob aumento de 400 x para realização das contagens.

O número de (oo)cistos nas amostras e o volume do sedimento foram utilizados para o cálculo do número de (oo)cistos.L⁻¹, de acordo com a equação (1) a seguir (FARIAS et al., 2002):

$$B = \frac{O \times S}{P \times V} \quad (1)$$

Em que:

B = nº (oo)cistos.L⁻¹;

O = média de oocistos contados nos pocinhos;

S = volume de sedimento, em mL, gerado após centrifugação;

P = volume de amostra, em mL, adicionada em cada pocinho;

V = volume da amostra em L, usada para retirada de oocistos.

3.2.2. Quantificação de esporos anaeróbios e de *Clostridium perfringens*

Para a pesquisa de esporos anaeróbios e de *Clostridium perfringens* foi empregada a técnica de membrana filtrante, segundo *Health Protection Agency* (2004). Inicialmente, a amostra foi tratada a 60°C por 15 min, em seguida, resfriada em banho de gelo e filtrada em sistema de vácuo, através de membrana de poros de 0,45 µm. Diluições seriadas foram realizadas nas amostras a fim de obter um resultado final de crescimento sempre inferior a 200 UFC por membrana. Após a filtração, a membrana foi disposta em placas com meio Triptose Sulfito Cicloserina, TSC (Himedia®), sendo essas incubadas em jarra com gerador de anaerobiose (Probac®) a 35 °C por 24 h. Todas as colônias crescidas nas placas eram consideradas esporos anaeróbios.

Foram selecionadas de 5 a 10 colônias típicas para serem transferidas para meio tioglicolato (Himedia®) e, posteriormente, incubadas a 35 °C por 24 h. A seguir, foram realizadas as seguintes provas bioquímicas para a confirmação das colônias típicas de *Clostridium perfringens*:

(i) Coloração de Gram: A partir de cultura pura em ágar estoque ou dos meios usados paralelamente, foi preparado o esfregaço e corado, para a observação de bastonetes retos com extremidades arredondadas, Gram-positivos;

(ii) Fermentação tempestuosa: Foi transferido 1 mL da cultura fresca obtida no meio tioglicolato para um tubo contendo meio leite com ferro. Um selo de vaselina esterilizado foi adicionado na superfície do tubo e incubado a 45 °C em banho-maria por 18 h a 24 h. Foi observada a ocorrência de coagulação tempestuosa do leite, com rompimento e deslocamento do coágulo, teste positivo, ou a ocorrência de coagulação normal ou não coagulação do leite, teste negativo;

(iii) Motilidade: Com o auxílio de uma agulha de inoculação, a cultura foi inoculada por picada, no centro do ágar nitrato motilidade previamente desaerado, até uma profundidade distante 1 cm do fundo do tubo. A incubação foi realizada a 35 °C ± 2°C por 24 h. A seguir, foi observado se houve migração de células para as regiões fora da linha de inoculação (teste positivo) ou se o crescimento restringiu-se à região da picada (teste negativo). As estirpes de *C. perfringens* são imóveis.

(iv) Redução de nitrato: Após a leitura da motilidade, foi acrescentado ao ágar nitrato motilidade usado no teste anterior, 0,5 a 1,0 mL de solução de alfa-naftol a 0,5% e 0,5 a 1,0 mL de solução de ácido sulfanílico a 0,8%. O desenvolvimento de coloração vermelha indicou a redução de nitrato a nitrito, característica de *C. perfringens*, teste positivo. Em caso negativo, adicionou-se 0,5 g de sulfato de zinco ao meio, observando se ocorria alteração de cor. Se o meio continuasse com a cor inalterada, não havia nitrato presente, indicando teste positivo. O aparecimento de uma cor rosa foi indicativo da não redução do nitrato;

(v) Fermentação da lactose e hidrólise da gelatina: Com o auxílio de uma agulha de inoculação, a cultura foi inoculada por picada, no meio lactose-gelatina. A incubação foi realizada a 35 °C por 24 – 48 h. Foi observada a formação de bolhas e viragem ácida do indicador vermelho de fenol, alterando a cor do meio de vermelha para amarela (fermentação positiva de lactose), ou se o meio permanece com a cor inalterada (fermentação negativa de lactose). Os tubos foram mantidos sob refrigeração por duas horas, observando em seguida, se o meio permanecia líquido (hidrólise positiva de gelatina) ou se adquiria consistência firme (hidrólise negativa de gelatina). As estirpes de *C. perfringens* fermentam a lactose e hidrolisam a gelatina;

(vi) Fermentação de carboidratos: A partir de uma cultura de 24 h em meio tioglicolato, foi inoculado 0,15 mL em tubos contendo meio de fermentação para *C. perfringens*. A incubação foi realizada a 35 °C por 24 h. A seguir, foi verificada a produção de ácido, transferindo-se 1 mL da cultura para um tubo de ensaio e adicionando duas gotas de solução de azul de bromotimol a 0,04%. O desenvolvimento de cor amarela no meio de cultura indicou teste positivo. Em caso negativo, a cultura foi reincubada e a produção de ácido foi verificada novamente com 48 h e 72 h de incubação. Estirpes de *C. perfringens* fermentam rafinose e não fermentam salicina.

Após a realização das provas bioquímicas, os resultados, expressos em log UFC.g⁻¹, foram calculados em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e porcentagem de colônias confirmadas.

3.2.3. Quantificação de esporos aeróbios e de *Bacillus* spp.

Para a quantificação de esporos aeróbios e de *Bacillus* spp. foi utilizada a técnica de membrana filtrante, como descrito por Rice et al. (1996). Antes da análise, a amostra foi tratada a 60 °C por 15 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada em

banho de gelo e filtrada em sistema de vácuo com o emprego de membrana com poros de 0,45 µm.

Diluições seriadas foram realizadas nas amostras a fim de obter um resultado final de crescimento sempre inferior a 200 UFC por membrana. Após a filtração, a membrana foi disposta sobre ágar nutriente (Himedia®) com azul de tripan e 0,1% de amido e incubada em câmara úmida a 35 °C por 20 h a 22 h. Após esse período, todas as unidades formadoras de colônias (UFC) contadas foram consideradas colônias originadas de esporos de bactérias aeróbias.

Foram considerados *Bacillus* spp., as colônias que formaram esporos aeróbios, Gram-positivos e apresentaram resultados positivos nos testes de catalase e de produção de ácido a partir de glicose.

3.2.4. Quantificação de coliformes a 35 °C e de *Escherichia coli*

Foi coletado um volume de 200 mL de água em garrafa de vidro com tampa de plástico, previamente esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 min). A amostra foi conservada a 6 °C ± 1 °C para posterior realização das análises de coliformes a 35 °C e *E. coli*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus* spp.

A quantificação de coliformes a 35 °C e *E. coli* foi realizada pela técnica do substrato definido, cromogênico-fluorogênico, com meio Colilert® (Quanty-tray®, IdexLaboratories Inc, US), expressa como NMP.100mL⁻¹ (APHA, 2005).

3.2.5. Quantificação de *Pseudomonas* spp.

A quantificação de *Pseudomonas* spp. foi realizada pela técnica de membrana filtrante, como descrito por APHA (2005). Diluições seriadas foram realizadas nas amostras a fim de obter um resultado final de crescimento sempre inferior a 200 UFC por membrana. Após a filtração, a membrana foi disposta sobre ágar Cetrimide (Himedia®) e incubada a 28 °C por 24 h.

3.2.6. Determinação da turbidez

As medidas de turbidez das águas foram realizadas em turbidímetro portátil (HACH[®], modelo 2100P, EUA), conforme descrito por *Standard Methods for Water and Wasterwater* (APHA, 2005).

3.3. Análises realizadas em alface

Foram coletados aleatoriamente de cada horta, cinco pés de alface do tipo lisa da cultivar Vitória de Santo Antão. Os pés de alface coletados encontravam-se no ponto de colheita para serem comercializadas no mercado local. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno esterilizados, devidamente identificadas e transportadas a $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao laboratório de Higiene Industrial para realização das análises.

3.3.1. Quantificação de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp.

3.3.1.1. Concentração das amostras

A concentração dos (oo)cistos foi realizada segundo metodologia descrita por Cook et al. (2006) com modificações. Foram pesados 50 g de amostra em saco de polietileno esterilizado e adicionado 300 mL de líquido extrator. Essa solução foi preparada anteriormente com 100 mL de Tween 80 a 1 %, 0,1 mL de anti-espumante (Anti-Foam A, Sigma Aldrick[®]) e 1000 mL de água destilada (q. s. p) e acondicionada em frasco de vidro esterilizado.

A amostra com o líquido extrator foi agitada em homogeneizador de amostras (Marconi[®], modelo MA 440/CF) por um minuto para facilitar a remoção dos oocistos da superfície da hortaliça. Após a agitação, o extrato foi filtrado em béquer de vidro de 500 mL utilizando-se peneira de aço inoxidável com abertura da malha de 106 μm . O extrato filtrado foi dividido em tubos e centrifugado a $2500 \times g$ por 10 min e o sobrenadante foi descartado. À medida que se realizou a centrifugação do extrato, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e realizou-se a lavagem com solução do líquido extrator nos mesmos de forma a juntar todos os sedimentos em um único tubo de centrífuga graduado ao final dessa etapa. Foi adicionado cinco vezes o volume de

água destilada foi adicionado ao sedimento contido no único tubo final. Essa amostra foi guardada a $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de visualização e enumeração de (oo)cistos que foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1.1.

O número de (oo)cistos foi expresso por 100 g. Para esse cálculo foram utilizadas as equações (2) e (3) a seguir (COOK et al., 2006, com modificações):

$$B = \frac{O \times S}{P \times V} \quad (2)$$

$$C = \frac{B}{A} \quad (3)$$

Em que:

B = nº oocistos. L^{-1} ;

O = média de oocistos contados nos pocinhos;

S = volume de sedimento, em mL, gerado após centrifugação;

P = volume de amostra, em mL, adicionada em cada pocinho;

V = volume do líquido extrator, em L, usado para retirada de oocistos;

C = nº oocistos. 100 g^{-1} ;

A = Peso da amostra em g.

3.3.2. Quantificação de esporos anaeróbios e de *Clostridium perfringens*

A pesquisa de esporos anaeróbios e de *Clostridium perfringens* seguiu metodologia descrita em *Compendium of methods for the examination of foods* (LABBE, 2001).

Foram pesados 10 g de amostra em saco de polietileno esterilizado e adicionado 90 mL de água peptonada a 0,1%. A homogeneização foi realizada por agitação em homogeneizador de amostras (Marconi[®], modelo MA 440/CF). Em seguida, essa mistura foi submetida a tratamento de $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min, em banho com temperatura controlada. O volume de água do banho foi suficiente para cobrir o saco até a altura da superfície do homogenato, iniciando a contagem do tempo de tratamento térmico a partir do momento em que os frascos atingiram a temperatura de $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o tratamento térmico, diluições seriadas foram realizadas e o plaqueamento foi feito pela

técnica de superfície em Ágar Triptose Sulfito Cicloserina, TSC (Himedia[®]) com sobrecamada.

Após a solidificação completa do meio, as placas não invertidas foram incubadas 35 °C por 18 h a 24 h em jarras apropriadas com gerador de anaerobiose. Para a contagem, foram selecionadas placas que continham entre 20 e 200 colônias negras. Essas colônias típicas foram contadas e o resultado foi expresso em log UFC.g⁻¹ de amostra e indica o número de esporos anaeróbios presentes.

Foram selecionadas de 5 a 10 colônias típicas para transferência para meio tioglicolato (Himedia[®]) e, posteriormente, incubadas a 35 °C por 24 h. A seguir, foram realizadas provas bioquímicas de coloração de Gram, fermentação tempestuosa, motilidade, redução de nitrato, fermentação de lactose e hidrólise de gelatina e fermentação de carboidratos, conforme descrito no item 3.2.4, para a confirmação das colônias típicas de *Clostridium perfringens*.

Após a realização das provas bioquímicas, os resultados expressos em log UFC.g⁻¹, foram calculados em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

3.3.3. Quantificação de esporos aeróbios e de *Bacillus* spp.

Para a quantificação de esporos aeróbios e *Bacillus* spp. seguiu-se a metodologia descrita no *Compendium of methods for the examination of foods* (STEVENSON e SEGNER, 2001).

Foram pesados 50 g de amostra em saco de polietileno esterilizado e adicionado 450 mL de água peptonada a 0,1%. A homogeneização foi realizada por 1 min em homogeneizador de amostras (Marconi[®], modelo MA 440/CF).

Foram transferidos 10, 1 e 0,1 mL da amostra homogeneizada para três Erlenmeyers diferentes, contendo 100 mL de caldo Triptona Glucose Extrato de Carne, TGE (Himedia[®]) previamente fundido e resfriado entre 50 °C a 55 °C. O inóculo foi bem homogeneizado ao meio de cultura e submetido a 80 °C por 30 min, em banho com temperatura controlada. O volume de água do banho foi suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície do meio, iniciando-se a contagem do tempo de tratamento térmico a partir do momento em que os frascos atingiram 80°C. Após o tratamento térmico, cada porção de 100 mL de TGE foi distribuída em 5 placas de Petri vazias previamente esterilizadas. Após completa solidificação do ágar, as placas

invertidas foram incubadas a 35 °C por 48 h. Para o cálculo dos resultados, foram contadas colônias desenvolvidas nas 5 placas da diluição apropriada para a contagem. O resultado foi expresso em log UFC.g⁻¹ de amostra e indicou o número de esporos aeróbios mesófilos presentes na amostra. Foram considerados *Bacillus* spp., microrganismos formadores de esporos aeróbios, Gram-positivos, com resultados positivos para teste de catalase e produção de ácido a partir de glicose.

3.3.4. Quantificação de coliformes a 35 °C e de *Escherichia coli*

A quantificação de coliformes a 35 °C e de *E. coli* em alface foi realizada pela técnica de plaqueamento em Petrifilm™ (3M) segundo *Compendium of methods for the examination of foods* (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

3.3.5. Quantificação de *Pseudomonas* spp.

A quantificação de *Pseudomonas* spp. em alface foi realizada pela técnica de plaqueamento em Agar Cetrimide (Himedia®) segundo *Compendium of methods for the examination of foods* (APHA, 2001).

3.4. Análises realizadas no adubo orgânico

Foram coletados de cada horta 500 g de adubo orgânico que foram acondicionados em sacos de polietileno esterilizados, devidamente identificados e transportados a 6 °C ± 1 °C ao laboratório de Higiene Industrial para realização das análises.

3.4.1. Quantificação de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp.

3.4.1.1. Concentração das amostras

A concentração das amostras de adubo orgânico foi realizada pela metodologia de flotação com cloreto de sódio descrita por Kuczinska e Shelton (1999).

Inicialmente, foram pesados 10 g de amostra e adicionados 100 mL de solução diluente composta por 50 mM Tris e Tween 80 a 0,5%. Essa mistura foi

homogeneizada em agitador magnético por 15 min, filtrada em peneira com malha de 45 µm e lavada com 100 mL de solução diluente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 10 min e os sedimentos formados foram reunidos em um único tubo de centrífuga, enxaguando-se os tubos vazios com 50 mL de solução diluente, passando-se em tubo por tubo. Essa solução diluente foi vertida no tubo que continha o sedimento. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensionado com 45 mL de solução de NaCl (S.G. = 1,21) e essa mistura foi agitada em vórtex. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Um volume de 5 mL de sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL e nesse foram adicionados 45 mL de água destilada. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Um volume de 25 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de 50 mL e adicionado 25 mL de água destilada. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Foram transferidos 5 mL do sobrenadante para um tubo de 15 mL e adicionados 10 mL de água destilada. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Um volume de 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubos com tampas apegadas (Eppendorf®) de 1,5 mL. Foi realizada centrifugação a 1500 x g por 3 min. O sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de água destilada esterilizada e reservado a 6 °C ± 1 °C até o momento da realização da pesquisa de (oo)cistos por imunofluorescência direta.

A visualização e enumeração de (oo)cistos foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1.1. Os resultados foram expressos em número de (oo)cistos por grama que foi determinado pela média da contagem do número de (oo)cistos em três pocinhos da lâmina.

3.4.2. Quantificação de esporos anaeróbios e *Clostridium perfringens*

A pesquisa de esporos anaeróbios e *Clostridium perfringens* seguiu metodologia proposta no *Compendium of methods for the examination of foods* (LABBE, 2001). Essa metodologia foi descrita no item 3.3.2.

3.4.3. Quantificação de esporos aeróbios e *Bacillus* spp.

A pesquisa de esporos aeróbios e *Bacillus* spp. seguiu metodologia proposta em *Compendium of methods for the examination of foods* (STEVENSON e SEGNER, 2001). Essa metodologia foi descrita no item 3.3.3.

3.4.4. Quantificação de coliformes a 35°C e de *Escherichia coli*

A quantificação de coliformes a 35 °C e de *E. coli* em alface foi realizada pela técnica de plaqueamento em Petrifilm™ (3M) segundo *Compendium of methods for the examination of foods* (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

3.4.5. Quantificação de *Pseudomonas* spp.

A quantificação de *Pseudomonas* spp. foi realizada pela técnica de plaqueamento em Agar Cetrimide (Himedia®) segundo *Compendium of methods for the examination of foods* (APHA, 2001).

3.5. Análises realizadas em solo

Foram coletados de cada horta 500 g de solo que foram acondicionados em sacos de polietileno esterilizados devidamente identificados e transportados a 6 °C ± 1 °C ao laboratório de Higiene Industrial para realização das análises.

3.5.1. Pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp.

3.5.1.1. Concentração das amostras

Para a concentração de amostras de solo foi utilizada metodologia de flotação com cloreto de sódio descrita por Kuczinska e Shelton (1999).

Inicialmente, foram pesados 25 g de amostra e adicionados 100 mL de solução diluente composta por 50 mM Tris e Tween 80 a 0,5% (v/v). Essa mistura foi homogeneizada em agitador magnético por 15 min, filtrada em peneira de 106 µm e lavada com 100 mL de solução diluente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas

a 500 x g por 10 min e os sedimentos formados foram juntados em um único tubo de centrífuga, enxaguando-se os tubos vazios com 50 mL de solução diluente, passando-se tubo por tubo. Essa solução diluente foi vertida no tubo que continha o sedimento. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensionado com 45 mL de solução de NaCl (S.G. = 1,21) e essa mistura foi agitada em vórtex. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Um volume de 5 mL de sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL e nesse tubo foram adicionados 45 mL de água destilada. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Um volume de 25 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de 50 mL e adicionado 25 mL de água destilada. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Foram transferidos 5 mL do sobrenadante para um tubo de 15 mL e adicionados 10 mL de água destilada. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. Um volume de 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubos com tampas apegadas (Eppendorf®) de 1,5 mL. Foi realizada centrifugação a 500 x g por 10 min. O sedimento foi ressuspensionado com 100 µL de água destilada e reservado sob refrigeração até o momento da realização da pesquisa de (oo)cistos por imunofluorescência direta.

A visualização e enumeração de (oo)cistos foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1.1. Os resultados foram expressos em número de (oo)cistos por 25 g, que foi determinado pela média da contagem do número de (oo)cistos em três pocinhos da lâmina multiplicado por 10.

3.5.2. Pesquisa de esporos anaeróbios e de *Clostridium perfringens*

A quantificação de esporos anaeróbios e de *Clostridium perfringens* seguiu metodologia proposta em *Compendium of methods for the examination of foods* (LABBE, 2001). Essa metodologia foi descrita no item 3.3.2.

3.5.3. Pesquisa de esporos aeróbios e de *Bacillus* spp.

A quantificação de esporos aeróbios e *Bacillus* spp. seguiu metodologia proposta em *Compendium of methods for the examination of foods* (STEVENSON e SEGNER, 2001). Essa metodologia foi descrita no item 3.3.3.

3.5.4. Quantificação de coliformes a 35 °C e de *Escherichia coli*

A quantificação de coliformes a 35 °C e *E. coli* em adubo orgânico foi realizada pela técnica de plaqueamento em Petrifilm™ (3M) segundo *Compendium of methods for the examination of foods* (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

3.5.5. Quantificação de *Pseudomonas* spp.

A quantificação de *Pseudomonas* spp. foi realizada pela técnica de plaqueamento em Agar Cetrimide (Himedia®) segundo *Compendium of methods for the examination of foods* (APHA, 2001).

3.6. Teste do desafio microbiológico

3.6.1. Microrganismos

Nessa pesquisa foram utilizados oocistos de *C. parvum*, isolados de bezerros recém-nascidos infectados, adquiridos da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba/MG. Foram utilizadas também células de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, cedidas pelo laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da UFV.

3.6.2. Preparo da suspensão de microrganismos

Os oocistos de *C. parvum* foram mantidos sob refrigeração a 6 °C ± 1 °C e encontravam-se em suspensão com concentrações de 1 x 10⁷ oocistos. mL⁻¹ em solução de tampão fosfato (PBS), estreptomicina, penicilina e Tween 20 a 0,01%.

Células de *P. fluorescens* ATCC 13525 foram mantidas criopreservadas a - 80 °C em caldo BHI (Himedia®) e glicerol na proporção de 30% (v/v). Antes da realização dos testes as células de *P. fluorescens* foram descongeladas e ativadas por três transferências em caldo BHI à temperatura de 26 °C em condições estáticas por 24 h. Após a terceira ativação, 1 mL da cultura foi transferido para tubos com tampas apegadas (Eppendorf®) esterilizados e centrifugada a 1900 x *g* por 10 min. O *pellet* formado foi lavado com água peptonada a 0,1% esterilizada e o procedimento repetido

por duas vezes. O *pellet* de células foi dissolvido e com ele foi preparada a suspensão de células.

Para serem inoculadas na alface as suspensões de oocistos de *C. parvum* e de células de *P. fluorescens* foram diluídas para que o número atingisse 10^5 oocistos.mL⁻¹ e 10^5 UFC.mL⁻¹, respectivamente.

3.6.3. Preparo da alface para contaminação intencional

A alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão foi adquirida em um mercado local da Cidade de Viçosa – MG e mantida a $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h antes de iniciar os experimentos. As folhas danificadas foram descartadas, sendo escolhidas para o estudo, as folhas íntegras, de cor verde claro. As folhas de alface foram lavadas em água corrente para remoção das sujidades visíveis. Em seguida foram higienizadas com solução de dicloroisocianurato de sódio (Sumaveg, Johnson Diversey®) a 200 mg.L^{-1} por 15 min, neutralizadas com solução de tiosulfato de sódio (Isofar®) a 0,5% (p/v) por 1 min e enxaguadas em água destilada esterilizada por 1 min. A seguir, a partir das folhas higienizadas, foram cortados cerca de 130 cupons com dimensões de 2 cm x 2 cm com o auxílio de uma lâmina cirúrgica e de um molde de aço inoxidável. Todo material que entrou em contato com a alface, como, recipientes, utensílios, lâminas e água foram esterilizados em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min e utilizados resfriados a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, aproximadamente. A alface foi manipulada sob técnicas assépticas.

3.6.4. Teste da exclusão microbiológica

Para garantir que os cupons de alface avaliados não continham ambos microrganismos avaliados nesse teste do desafio antes da contaminação intencional, foram realizados testes de exclusão microbiológica. Esses testes garantiam que células de *P. fluorescens* e oocistos de *C. parvum* que estavam nos cupons de alface eram provenientes somente da contaminação intencional e não da microbiota natural da hortaliça após a higienização. Dessa forma, em cada repetição desse experimento, cinco cupons com área total de 40 cm^2 foram avaliados quanto à presença desses microrganismos após o procedimento de higienização inicial que foi realizado em todas as folhas de alface antes de receberem os inóculos.

Para cada avaliação, foram adicionados aos cinco cupons 10 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada a 121 °C por 15 min. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de vórtex por 1 min e, em seguida, foram realizadas diluições decimais do homogeinato. Alíquotas de 1 mL das diluições escolhidas foram plaqueadas em profundidade em ágar Cetrimide (Himedia®) e incubadas a 26 °C por 48 h, para confirmar a ausência de *P. fluorescens*. O restante do homogeinato foi avaliado quanto à presença de oocistos de *C. parvum* utilizando-se procedimentos de centrifugo-concentração a 2500 g por 10 min (COOK et al., 2006 com modificações) e o sobrenadante foi descartado. Cinco vezes o volume de água destilada foi adicionado ao sedimento contido no único tubo final. Essa amostra foi guardada a 6 °C ± 1 °C até o momento de visualização e enumeração de (oo)cistos que foram realizadas utilizando-se o kit diagnóstico Merifluor® (Meridian Bioscience, Inc.), conforme descrito no item 3.2.1.1.

3.6.5. Contaminação intencional da folha de alface

Cada cinco cupons de alface foram assepticamente acondicionados em um tubo exclusivo de centrifuga com 10 mL de água peptonada a 0,1% previamente esterilizado a 121 °C por 15 min. Em cada tubo, com o auxílio de uma micropipeta, foi adicionado 1 mL da cultura do microrganismo testado, na ordem de 10^5 oocistos.mL⁻¹ quando *C. parvum* foi avaliado em culturas pura e mista e 10^5 UFC.mL⁻¹ quando *P. fluorescens* foram avaliadas em cultura mista com *C. parvum*. Os cupons intencionalmente contaminados com as células e, ou oocistos foram armazenados sob temperatura de 25 °C por 12 h para a adesão dos microrganismos.

3.6.6. Preparo das soluções surfactantes

A remoção de oocistos de *C. parvum* aderidos em cultura pura ou em cultura mista com *P. fluorescens* em cupons de alface foi avaliada nesse experimento pela utilização de três diferentes surfactantes: cloreto de benzalcônio (CB), Tween 80 (TWE) e dodecil sulfato de sódio (SDS). Nesses testes foram preparadas e utilizadas soluções surfactantes em diferentes concentrações, descritas na Tabela 1. Além disso, foi realizado um teste controle, com a substituição do surfactante por água destilada esterilizada.

Inicialmente foram preparados 500 mL de solução estoque na concentração mais alta de cada tipo de surfactante em água destilada esterilizada, entre 20 °C e 25 °C. A partir de cada solução mais concentrada, foram preparadas, por diluição em água destilada esterilizada, as demais concentrações de trabalho. A cada vez que se realizava um ensaio, uma nova solução estoque foi preparada de forma a garantir que a mesma mantinha-se com características constantes.

Tabela 1 – Tipos de surfactantes e concentrações utilizadas para avaliação da remoção de *C. parvum* e *P. fluorescens*, aderidos a 25 °C por 12 h, em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão

Surfactante	Marca	Concentração (mg.L ⁻¹)
Cloreto de Benzalcônio	Sigma Química [®]	400
		800
		1200
		1600
		1900
Tween 80	Sigma Aldrich [®]	3
		5
		10
		25
		50
Dodecil Sulfato de Sódio	Vetec [®]	1000
		2000
		5000
		7000
		10000

O critério de seleção dessas concentrações foi realizado de modo a avaliar as diferentes soluções surfactantes em concentrações inferiores, próximas e superiores à concentração a partir da qual se inicia o processo de formação das micelas, ao qual se dá o nome de micelização e é denominada de Concentração Micelar Crítica (CMC). Dessa forma, a CMC de CB, TWE e SDS são 1876 mg.L⁻¹ (SMITH et al., 2002), 5 mg.L⁻¹ (FUNCK e SILVEIRA, 1987; BEHRING et al., 2004) e 2310 mg.L⁻¹ (VOLPE e SILVA FILHO, 1997; BEHRING et al., 2004; RIZZATTI et al., 2009), respectivamente.

3.6.7. Ação dos surfactantes sobre os microrganismos aderidos

Após o tempo de 12 h de adesão do(s) microrganismo(s), os cupons de alface foram retirados da suspensão e rinsados em 10 mL de água destilada esterilizada por 1 min para a retirada de oocistos e, ou células bacterianas na forma planctônica. Os cupons foram transferidos para um volume de 10 mL de solução surfactante na concentração desejada por 10 min. No caso do teste controle, os cupons foram transferidos para 10 mL de água destilada esterilizada por 10 min. Quando o surfactante utilizado foi o CB, os cupons foram neutralizados em 10 mL de Tween 80 a 2% por 1 min. Em seguida, os cupons foram transferidos para uma solução de 10 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada, onde foram submetidos à agitação em vórtex por 2 min para retirada das células e oocistos que restaram após a aplicação dos surfactantes.

3.6.8. Recuperação de microrganismos após aplicação dos surfactantes

A recuperação de oocistos de *C. parvum* foi realizada por centrifugação da suspensão a 2500 x g por 10 min (COOK et al., 2006) e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado cinco vezes o volume de água destilada ao sedimento contido no único tubo final. Essa amostra foi guardada a 6 °C ± 1 °C até o momento de visualização e enumeração de (oo)cistos que foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1.1. O número de (oo)cistos foi expresso por cm⁻². Para esse cálculo foram utilizadas as Equações (4) e (5):

$$B = \frac{O \times S}{P \times V} \quad (4)$$

$$C = \frac{B}{A} \quad (5)$$

Em que:

B = n° oocistos.mL⁻¹;

O = média de oocistos contados nos pocinhos;

S = volume de sedimento, em mL, gerado após centrifugação;

P = volume de amostra, em mL, adicionada em cada pocinho;
V = volume do líquido extrator, em L, usada para retirada de oocistos;
C = nº oocistos.cm⁻²;
A = Área total dos cupons de alface (40 cm²).

A recuperação de células de *P. fluorescens* foi realizada por plaqueamento em Ágar Cetrimide (Himedia®) a 26 °C por 48 h. O número de células de *P. fluorescens* recuperadas foi expresso em UFC.cm⁻² e calculado segundo a Equação (6):

$$U = \frac{C \times D \times V}{A} \quad (6)$$

Em que:

U = nº de UFC de *P. fluorescens* por cm²

C = Contagem de UFC de *P. fluorescens* após aplicação do surfactante;

D = Inverso da diluição utilizada para plaqueamento;

V = Volume de solução de água peptonada 0,1 % usada para retirada de células após a aplicação do surfactante;

A = Área total dos cupons de alface (40 cm²).

Foram calculados os números de reduções decimais (RD) para cada tratamento de aplicação do surfactante. Dessa forma, utilizou-se a Equação (7) para realizar o cálculo do número de RD.

$$RD = X_0 - X_1 \quad (7)$$

Em que:

RD = número de reduções decimais;

X₀ = log₁₀ do número de oocistos de *C. parvum* por cm² ou log₁₀ do número de células de *P. fluorescens*, ambos aderidos à superfície dos cupons de alface, antes do tratamento com os surfactantes;

X₁ = log₁₀ do número de oocistos de *C. parvum* por cm² ou log₁₀ do número de células de *P. fluorescens*, ambos após a aplicação dos surfactantes.

A atividade de remoção e, ou de inativação de oocistos e células das soluções surfactantes foi avaliada pelos números de ciclos logarítmicos reduzidos na população de *C. parvum* e de *P. fluorescens*.

3.7. Análise dos resultados

Foi verificada a ocorrência dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nos períodos de seca e de águas em diferentes hortas produtoras de alface que foram denominadas como “unidades produtoras”. Para isso, foram realizados quatro experimentos por período com o objetivo de comparar cinco unidades produtoras no delineamento em blocos casualizados com três repetições. Os quatro experimentos foram referentes às amostras de alface, água, solo e adubo. Cada experimento foi realizado em esquemas de parcelas subdivididas, a 5% de probabilidade, onde as unidades produtoras com cinco níveis (UP1, UP2, UP3, UP4 e UP5), foram distribuídas às parcelas de cada bloco e a estação com dois níveis (seca e águas) foi distribuída às subparcelas.

Foi realizada uma análise de variância com posterior aplicação do teste de Tukey a 5 % de probabilidade às médias das fontes de água das unidades produtoras com cinco níveis (UP1, UP2, UP3, UP4 e UP5) e teste F às médias das estações com dois níveis (seca e águas), de acordo com a significância da interação entre os dois fatores.

Para as características avaliadas que não atenderam a, pelo menos, uma das pressuposições de independência, normalidade e homogeneidade de variâncias dos efeitos do erro experimental, foi realizada uma análise descritiva por meio da construção de gráficos de colunas.

Foram realizadas análises de regressão, com o objetivo de verificar a dependência da ocorrência dos microrganismos na alface em função daquelas medidas em água, solo e adubo orgânico. Também foram realizadas análises de regressão para verificar a dependência de ocorrência de microrganismos no solo em função dos microrganismos presentes em água e adubo orgânico. Os coeficientes foram testados pelo t a 5% de probabilidade.

Nos quatro experimentos (água, alface, adubo orgânico e solo), separadamente, foram feitas análises de correlação entre as ocorrências de *Cryptosporidium* spp.,

Giardia spp., diferentes parâmetros microbiológicos (esporos anaeróbios, *C. perfringens*, esporos aeróbios, *Bacillus* spp., coliformes a 35 °C, *E. coli* e *Pseudomonas* spp.) e turbidez. Os coeficientes de regressão e as correlações foram testados pelo teste t a 5 % ou a 1% de probabilidade.

No teste do desafio microbiológico foi realizado um experimento para estudar os efeitos dos tipos de cultura (mista e pura), dos surfactantes (cloreto de benzalcônio – “CB”, Tween 80 – “TWE” e Dodecil sulfato de sódio – “SDS”) e das suas concentrações (CB: 400 mg.L⁻¹, 800 mg.L⁻¹, 1200 mg.L⁻¹, 1600 mg.L⁻¹ e 1900 mg.L⁻¹; TWE: 3 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹; SDS: 1000 mg.L⁻¹, 2000 mg.L⁻¹, 5000 mg.L⁻¹, 7000 mg.L⁻¹ e 10000 mg.L⁻¹) sobre a remoção de oocistos de *C. parvum* e células de *P. fluorescens* aderidos às folhas de alface. Esse experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento, constituídos de 90 combinações (*P. fluorescens* e *C. parvum*) ou 45 combinações (*P. fluorescens*). De acordo com a significância das interações, foram realizados os teste F para comparar as médias dos dois tipos de culturas (pura e mista), o teste de Tukey para as médias dos surfactantes e a análise de regressão para verificar o efeito da concentração dentro de cada surfactante sobre a remoção dos microrganismos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas a 5% de probabilidade e todos os resultados foram analisados pelo Sistema de Análises Estatísticas – SAEG versão 9.0 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em hortas de alface

Tanto *Cryptosporidium* spp. quanto *Giardia* spp. foram encontrados na água proveniente do córrego usada na propriedade 4 (Figura 1) e o número de (oo)cistos apresentou diferença ($P < 0,05$) entre as épocas avaliadas, sendo mais elevados nos períodos de águas. Dessa forma, observaram-se aumentos nas médias de contagens de *Cryptosporidium* spp. em água de irrigação de 6,3 oocistos·L⁻¹ para 22,3 oocistos·L⁻¹ e de *Giardia* spp de 10,3 cistos·L⁻¹ para 31,7 cistos·L⁻¹, nos períodos de seca e águas, respectivamente (Figura 1).

Esses resultados reiteraram a interferência da pluviosidade na ocorrência de (oo)cistos de protozoários na água, conforme já relatado por outros autores (ATHERHOLT et al., 1998; BASTOS et al., 2004; DAVIES et al., 2004; DIAS et al., 2008; HELLER et al., 2006). Vários fatores contribuem para a ampla dispersão dos cistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente: as formas de resistência destes protozoários são capazes de sobreviver aos processos de cloração da água e apresentam elevada persistência às condições adversas ambientais; por exemplo, em águas superficiais de rios, permanecem infectantes por até seis meses, a uma temperatura de 20 °C (FAYER et al., 2000).

Apesar de ter sido comprovada a ocorrência desses protozoários em uma das fontes de água, deve-se ressaltar a inexistência de dados devidamente documentados e comprovados sobre a ocorrência de surtos de giardiose e de criptosporidiose de transmissão hídrica no Brasil (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009). Os surtos descritos até o momento, em sua maioria, referem-se a episódios que

ocorreram entre crianças que freqüentavam creches (GONÇALVES et al., 2006), com via de transmissão por contato interpessoal (FRANCO, 2007).

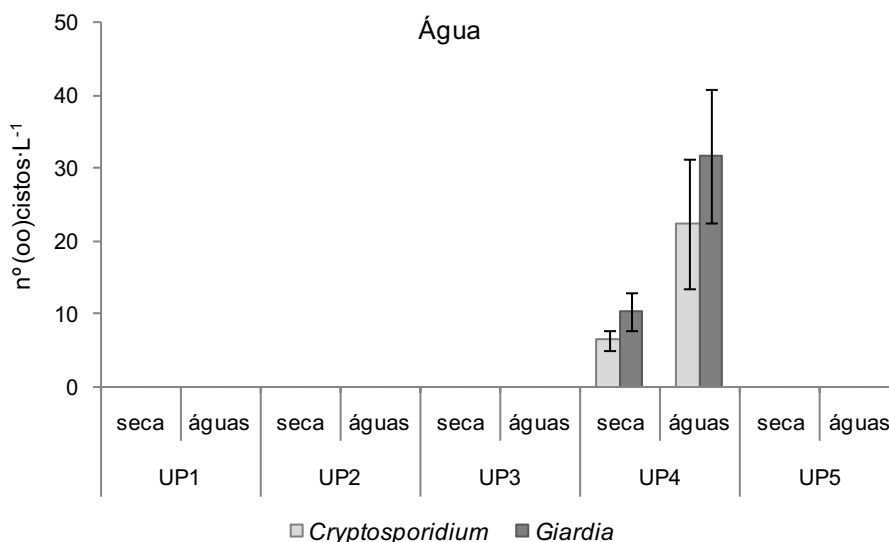


Figura 1 - Caracterização parasitológica de água de irrigação de fontes de abastecimento em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições.

Pesquisas realizadas nos EUA demonstraram que mais que 80% das águas superficiais de lagos, rios, represas e córregos) e 26% das águas tratadas analisadas continham oocistos de *Cryptosporidium*, com densidade entre de 0,001 e 484 oocistos·L⁻¹ em águas superficiais e de 0,005 a 0,17 oocistos·L⁻¹ em águas tratadas (SMITH e ROSE, 1998). Do mesmo modo, foram detectados oocistos em 77% e 75% de amostras de água de rios e lagos dos EUA respectivamente, em 83% das águas superficiais protegidas da atividade humana e em 28% das amostras de água tratada (ROSE, 1988).

Outros estudos realizados nos EUA relataram ocorrência de oocistos em águas superficiais de 0,02 a 1,3 oocistos·L⁻¹. Áreas protegidas da atividade antrópica continham concentrações entre 0,02 a 0,08 oocistos·L⁻¹, enquanto represas e lagos que receberam descarga de efluentes e águas provenientes de atividades agropecuárias continham concentrações de 0,91 a 2,58 oocistos·L⁻¹ e rios de 0,94, 1,09 e 1,2 oocistos·L⁻¹ (ROSE, 1990).

As unidades produtoras 1, 2, 3, 4 e 5 (Figura 2) utilizavam fontes de água para irrigação das hortaliças provenientes de poço semi-artesiano, mina, nascente, córrego e poço artesiano, respectivamente. Vale ressaltar que a água da unidade produtora 1 era bombeada de dois poços semi-artesianos para um tanque de fibra de vidro aberto e sem procedimentos de higienização regulares (Figura 3a). O tanque reservatório não era higienizado com frequência, assim, foi observada a presença de algas, que deixavam a água com coloração esverdeada (Figura 3b). Algo semelhante ocorreu na unidade produtora 2, onde a água da mina era bombeada para um tanque de alvenaria grande (Figura 4a) e, posteriormente, a água contida nesse lugar era transportada por gravidade para um outro tanque menor (Figura 4b), ambos em más condições higiênicas. Essas condições possibilitavam o acesso de animais que poderiam ser fonte de contaminação desses ambientes. Nas demais unidades produtoras, a água era bombeada da fonte de abastecimento diretamente para as hortas. Foi constatado que em todas as fontes não existia tratamento da água destinada à irrigação de hortaliças.

Observou-se que ambos protozoários não foram encontrados nas águas de irrigação provenientes de poço semi-artesiano (UP1), mina (UP2), nascente (UP3) e poço artesiano (UP5), conforme mostrado na Figura 1. No entanto, no Brasil, em estudo realizado em Fortaleza, a ocorrência de *Cryptosporidium* em água de poços foi de 22,2% das 18 amostras analisadas (NEWMAN et al., 1994). Gamba et al. (2000) analisaram 8 amostras de água de poços utilizadas para consumo no município de Itaquaquecetuba, São Paulo, observando-se a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em 100% das amostras. Thompson (2000) observou a presença de oocistos em 50% das seis amostras de água para consumo. Ré (1999) pesquisou a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em cinco amostras de água tratada e sete amostras de água de poços. Oocistos de *Cryptosporidium* não foram detectados em nenhuma das amostras, enquanto que cistos de *Giardia* foram somente detectados em 16,66% das amostras de água tratada.



Figura 2 - Unidades produtoras de alface de acordo com suas respectivas fontes de água para irrigação: (1) poço semi-artesiano; (2) mina; (3) nascente; (4) córrego e (5) poço artesiano.

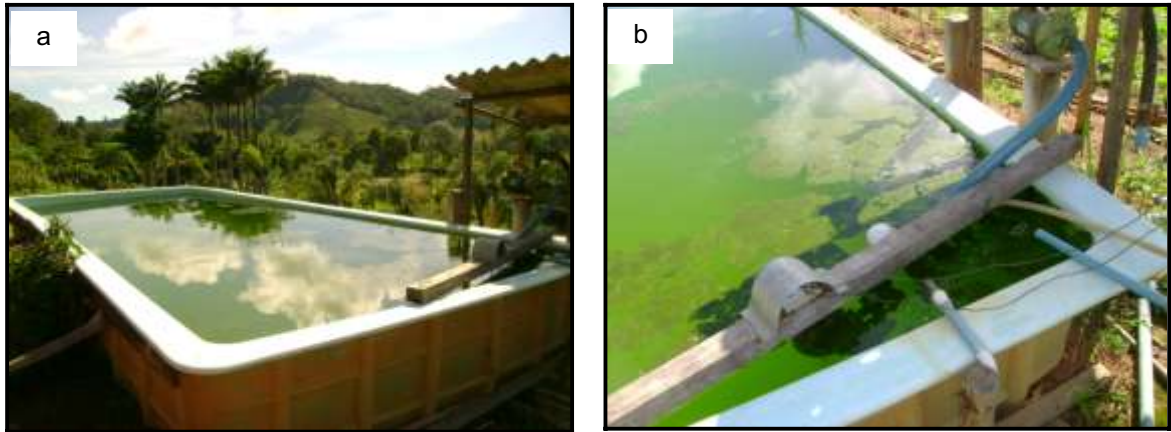


Figura 3 - Reservatório utilizado para armazenagem de água proveniente de dois poços semi-artesianos antes do bombeamento para irrigação das hortaliças da unidade produtora 1.

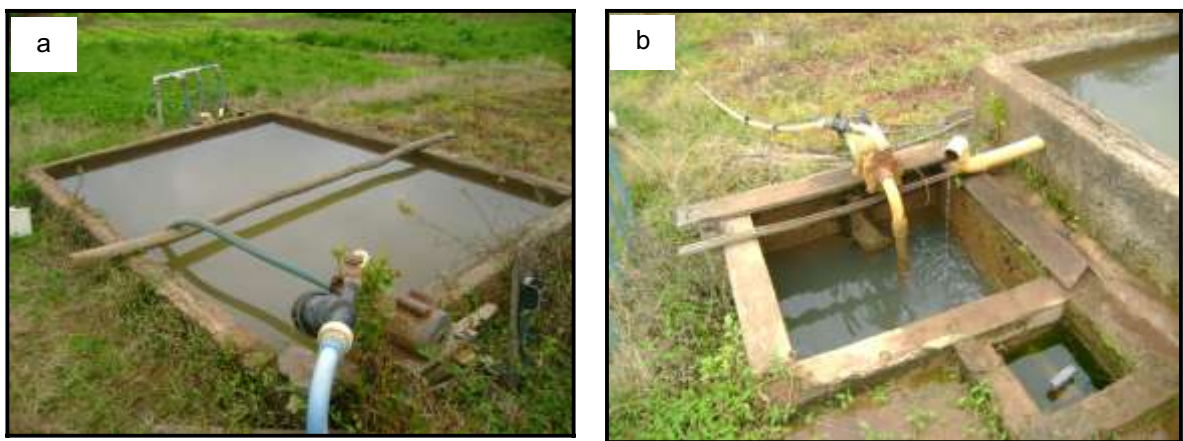


Figura 4 - Reservatórios utilizados para armazenagem de água proveniente de mina antes do bombeamento para irrigação das hortaliças da unidade produtora 2.

Foram comprovados em outros estudos que, em geral, a água usada na irrigação é proveniente de rios, córregos, lagos, minas ou poços adjacentes às hortas, sendo raro o uso de água de abastecimento público. Isso ocorre devido principalmente ao seu alto custo, uma vez que a demanda de água exigida para este propósito é bastante alta. Portanto, a água destinada à irrigação é transportada através de bombas ou canais desde a fonte de abastecimento até as hortas, sem qualquer tratamento prévio, podendo constituir uma fonte potencial de enteropatógenos para o vegetal a ser irrigado (OLIVEIRA e GERMANO, 1992; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002; SOARES e CANTOS, 2005).

No meio rural, o risco de ocorrência de surtos de doenças veiculadas pela água é muito alto, principalmente em função da possibilidade de contaminação bacteriana de

águas que muitas vezes são captadas em poços inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais (STUKEL et al., 1990).

Constatou-se que apenas as alfaces pertencentes à unidade produtora 4 apresentaram resultados positivos para presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Figura 5). Assim, quando foram avaliadas amostras de alface irrigadas com água de córrego durante o período de seca, foram encontrados resultados médios de 15,6 oocistos·(100 g)⁻¹ de *Cryptosporidium* spp. e 37,9 cistos·(100 g)⁻¹ de *Giardia* spp. Durante o período das águas, houve aumento da contaminação para 46,7 oocistos·(100 g)⁻¹ e 66,8 cistos·(100 g)⁻¹. Dessa forma, houve diferença no número de (oo)cistos entre os períodos (P < 0,05).

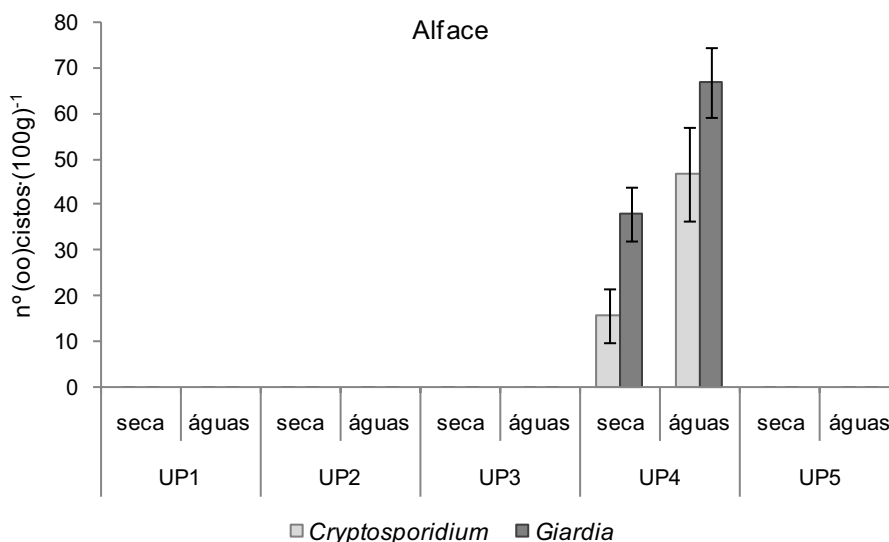


Figura 5 - Caracterização parasitológica de alface produzida em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições.

Antunes (2009) avaliou o consumo de alface pelos usuários de restaurantes da cidade de Viçosa, MG. Assim, durante o período de avaliação, foi constatado que 47,6 % consomem a porção pequena de alface estimada em 8,0 g, 43,2 % consomem a porção média estimada em 20 g, 7,5 % consomem a porção grande estimada em 30 g e 1,8 % não consomem alface em suas refeições. A partir dos resultados encontrados por Antunes (2009) relacionando-se com os resultados de ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* nessa pesquisa, principalmente durante o período das

águas, pode-se dizer que há um perigo à população consumidora das porções média e grande de alface, uma vez que a dose infecciosa desses protozoários é relativamente baixa. Segundo Schlundt et al. (2004), 10 oocistos são capazes infectar humanos, dependendo do estado imunológico do indivíduo e do genótipo do *Cryptosporidium*. A dose infecciosa de *Giardia* pode variar entre 10 e 100 cistos de acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004).

Outros trabalhos constataram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. (CAPUANO, et al., 2001; TAKAYANAGUI et al., 2001; SILVA et al., 2005) e de *Giardia* spp. (OLIVEIRA e GERMANO, 1992; TAKAYANAGUI et al., 2000; TAKAYANAGUI et al., 2001) em folhas de alface comercializadas em diferentes cidades brasileiras.

É provável que a contaminação das hortaliças por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas como *Giardia* spp. seja proveniente, em especial, das condições sanitárias do ambiente em que são cultivadas, das práticas de cultivo, da qualidade da água usada na irrigação e na higienização antes de serem comercializadas em supermercados, feiras e sacolões (SILVA et al., 2005). A Figura 6 mostra a presença de animais domésticos e de gado próximos às plantações de alface, o que pode favorecer a ocorrência de (oo)cistos nas hortaliças devido à disseminação dessas estruturas por suas fezes.



Figura 6 - Acesso de animais às hortas que podem ser fontes de contaminação desses ambientes.

A contaminação das hortaliças avaliadas nesse experimento poderia ser proveniente da água, do adubo orgânico compostado ou do solo. No entanto, foi possível observar que somente a água utilizada na irrigação foi a principal fonte de contaminação de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. (Tabela 2). Assim, a

contaminação parasitológica da alface descreveu uma relação direta entre o número de protozoários presentes na hortaliça e o número de protozoários na água (Tabela 2).

Tabela 2 - Estimativas das equações de regressão da contaminação microbiológica de alface em função da contaminação da água de irrigação usada nas unidades produtoras

Microrganismo	Equação de Regressão	R ² (%)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	$\hat{Y} = 1,867 + 0,870*AG$	92,90
<i>Giardia</i> spp.	$\hat{Y} = 1,738 + 3,166*AG$	89,40

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05)

\hat{Y} = número de (oo)cistos(100g)⁻¹ de alface; AG = microrganismo avaliado na água

Segundo Pacheco et al. (2002), as águas destinadas à irrigação são fontes originais de contaminação quando comportam grande quantidade de microrganismos como enteroparasitas e bactérias. Dessa forma, alimentos que estão em contato direto com águas contaminadas e são consumidos crus constituem fontes prováveis desses microrganismos e merecem especial atenção, principalmente nos países em desenvolvimento, onde o estado nutricional da população é precário, interferindo diretamente nas condições imunológicas dos indivíduos. Crianças, imunodeprimidos e debilitados são considerados grupos susceptíveis, favorecendo o aparecimento dessas enfermidades.

Foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. apenas nos adubos orgânicos utilizados em duas unidades produtoras. Na unidade produtora 1, foram encontrados (oo)cistos somente no período chuvoso. Enquanto que na unidade produtora 4, os (oo)cistos estavam presentes em ambos os períodos (Figura 7). Isso pode ter ocorrido devido ao não cumprimento do período mínimo de realização da compostagem do adubo orgânico que é de, aproximadamente, quatro meses. Essa prática de realização de compostagem de adubo em tempo inferior ao recomendado é muito comum na região avaliada e foi relatada por alguns proprietários das hortas. A Figura 8 ilustra os adubos orgânicos em compostagem em algumas unidades produtoras avaliadas. Apesar de ter havido ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. no adubo das unidades produtoras 1 e 4 (Figura 7), esse fato demonstrou que a presença dos protozoários no adubo pode contribuir para a contaminação da alface, no entanto, não é determinante para que isso ocorra (Figura 5).

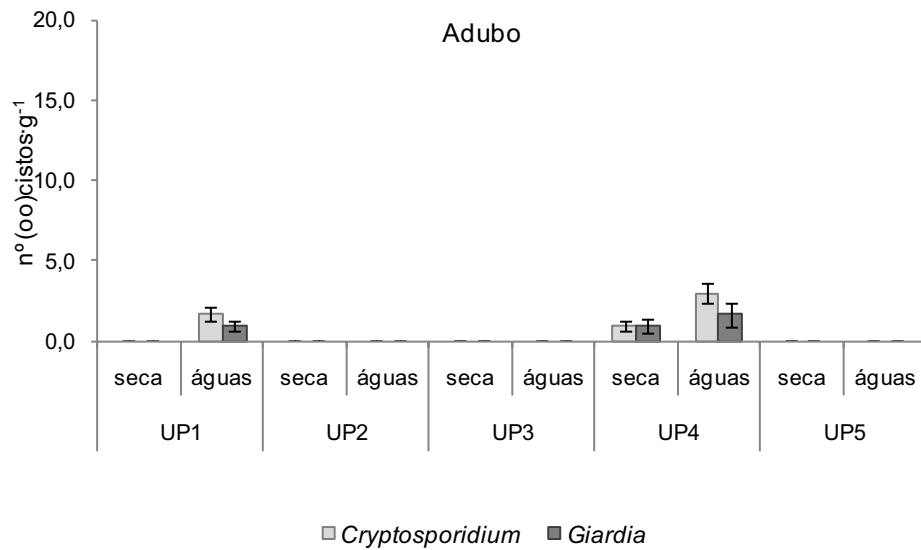


Figura 7 - Caracterização parasitológica de adubo orgânico produzido em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições.



Figura 8 - Compostagem de adubo orgânico em unidades produtoras de alface situadas na região de Viçosa - MG.

A utilização de adubos de animais, compostos orgânicos ou outra fonte de adubos recomendada pelas normas técnicas de produção, tem demonstrado uma elevada eficiência na melhoria da fertilidade dos solos e no desempenho técnico e econômico de cultivos (SOUZA, 2003). No entanto, a incorporação de adubos mal tratados no solo pode ser uma fonte importante de contaminação microbiológica, tanto para os produtos provenientes do sistema orgânico como daqueles oriundos do sistema convencional (DAROLT, 2003).

Quando se avaliou o solo, foi constatada presença de *Cryptosporidium* spp. em apenas duas unidades produtoras com concentrações médias de 6,40 oocistos·(25 g)⁻¹ e 5,30 oocistos·(25 g)⁻¹. A presença de *Giardia* spp. foi relatada nas unidades produtoras 3, 4 e 5 com contaminações médias variando entre 6,70 e 13,30 cistos·(25 g)⁻¹. Quando presentes, ambos protozoários foram encontrados em maior quantidade no período das águas (Figura 9).

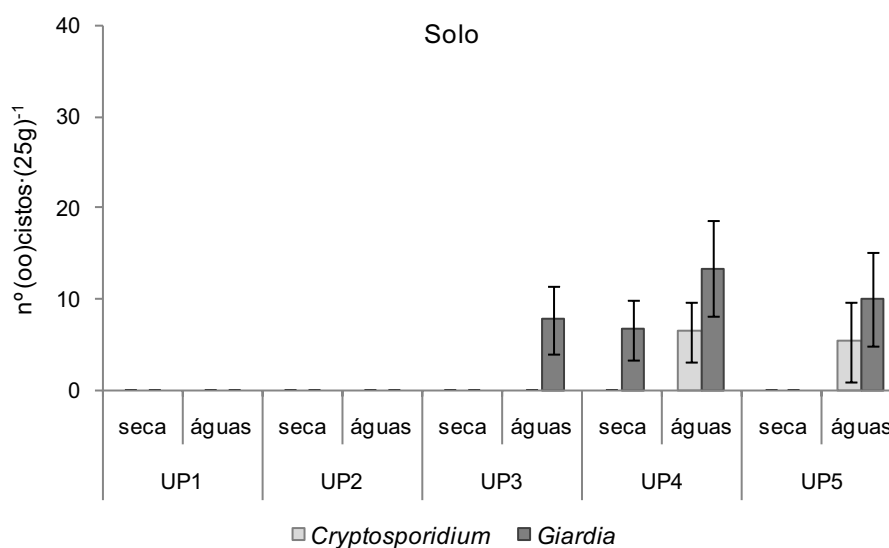


Figura 9 - Caracterização parasitológica de solo presente em cinco unidades produtoras (UP) de alface, situadas na região de Viçosa – MG, nos períodos de seca e águas, médias de três repetições.

Apesar da contaminação evidente de determinadas amostras de adubo e de solo em algumas propriedades, essa pesquisa evidenciou que a principal fonte de transmissão de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foi a água de irrigação de má qualidade. Esse resultado foi confirmado pelo fato de apenas as alfaces cultivadas na unidade produtora 4 terem apresentado contaminação com os protozoários e que essa

mesma propriedade foi a única que apresentou água com a presença desses microrganismos.

4.2. Avaliação de diferentes parâmetros de qualidade na produção alface

4.2.1. Turbidez da água usada para irrigação

Valores de turbidez das águas usada para irrigação de alface e de pluviosidade durante os dois períodos avaliados podem ser observados na Figura 10. Em geral, a turbidez foi menor no período de seca. Pode-se observar que os menores valores de turbidez foram observados na água de irrigação das unidades produtoras 1, 3 e 5, as quais apresentaram 0,78, 0,98 e 0,63 UNT, respectivamente.

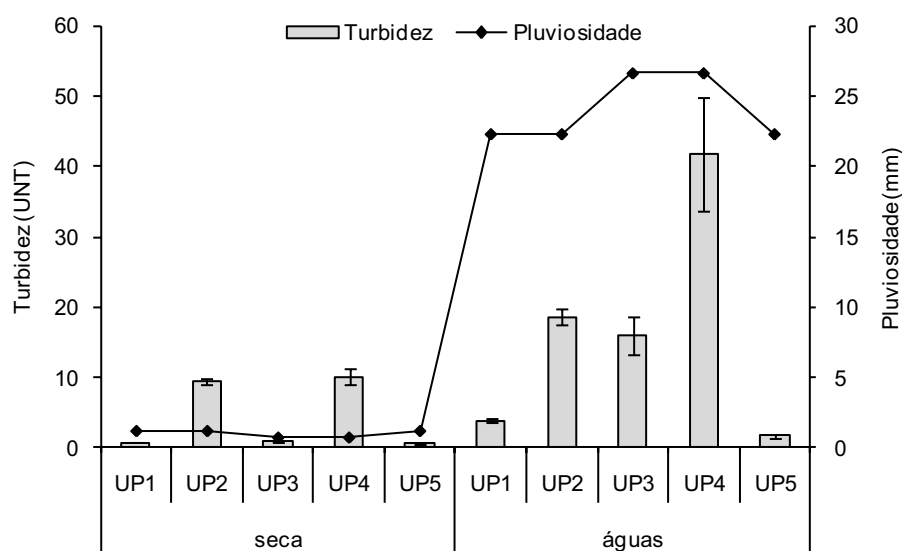


Figura 10 - Valores médios de turbidez da água utilizada na irrigação de alface, expressos em Unidades Nefelométricas de Turbidez (UNT) e medidas de pluviosidade média da semana de coleta, expressas em mm, segundo a unidade produtora (UP), avaliadas nos períodos de seca (maio a setembro) e águas (outubro a fevereiro).

Verificou-se que a água da unidade produtora 2 apresentou uma turbidez média de 9,49 UNT na seca e de 18,67 UNT nas águas (Figura 10). Um problema com relação à turbidez dessa água era a forma incorreta de armazenamento da mesma, pois a água da mina era bombeada para um tanque de alvenaria grande e, posteriormente, a água contida nesse lugar era transportada por gravidade para outro

tanque de alvenaria menor, sem qualquer condição higiênica, conforme ilustrado anteriormente na Figura 4. Em conseqüência disso, a água ficava exposta às diversas variações climáticas, além das possíveis fontes de contaminação favoráveis ao local de armazenamento como, por exemplo, o acesso de animais.

A turbidez mais elevada foi observada na água proveniente do córrego, unidade produtora 4, em ambos períodos de avaliação, alcançando valores médios de 41,80 UNT durante a época das águas (Figura 10). Um exemplo ilustrativo do aumento da turbidez da água do córrego durante o período de maior pluviosidade é mostrado na Figura 11b.

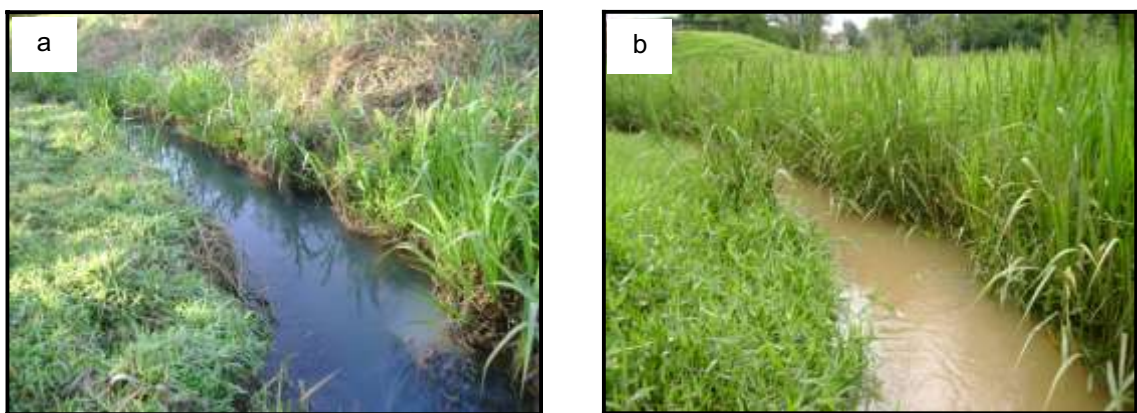


Figura 11 - Turbidez da água do córrego, pertencente à unidade produtora 4, durante os períodos de seca (a) e águas (b).

Vale ressaltar que a Resolução nº 357/MMA estabelece, dentre várias condições de qualidade da água, que o padrão de turbidez para águas usadas para irrigação de hortaliças que são consumidas cruas não deve ultrapassar 40 UNT (BRASIL, 2005). Essa resolução não aborda a contaminação da água por protozoários. Assim, avaliando-se a turbidez encontrada nas diferentes fontes de água das unidades produtoras, todas as águas estavam de acordo com essa recomendação para água de irrigação, com exceção da água da unidade produtora 4 na época de águas. No entanto, em alguns estudos foi observado que valores de turbidez elevados podem estar associados com a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (LECHEVALLIER et al., 1991; FOX et al., 1996; MEDEMA et al., 1998; FRANCO et al., 2001b) devido à aderência dos (oo)cistos a compostos orgânicos e inorgânicos responsáveis por esse parâmetro físico-químico de qualidade. Esses estudos estão de acordo com os resultados desse trabalho, pois foram encontrados (oo)cistos de

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. justamente na fonte de água que apresentou os maiores valores de turbidez.

Assim, quanto maior o grau de turbidez, maior possibilidade da presença desses protozoários. A Portaria nº 518/MS (BRASIL, 2004) relaciona o grau de turbidez da água com a presença de *Cryptosporidium* spp., entretanto, não está relacionada com água utilizada para irrigação de hortaliças. Dessa forma, essa legislação recomenda um valor máximo de 0,5 UNT para o grau de turbidez da água potabilizada no que se refere ao controle de *Cryptosporidium* spp. No entanto, foi observado que os oocistos ainda ocorrem quando a turbidez encontra-se com o valor de 0,19 UNT, de forma que a garantia de segurança efetiva seria obtida com a turbidez de 0,10 UNT (LeCHEVALLIER et al., 1991).

Como descrito anteriormente, a ocorrência de (oo)cistos de protozoários é maior na época das águas. Esses resultados reforçam a influência do aumento da pluviosidade sobre a ocorrência de (oo)cistos em água de córrego e em alfaces provenientes da unidade produtora 4. Comportamento semelhante foi observado em outros trabalhos os quais ressaltaram que os períodos de estiagem favorecem a estagnação da água nos córregos, lagos e reservatórios e o florescimento de algas. Em contrapartida, os períodos chuvosos acarretam a ressuspensão do material sedimentado no fundo de lagos e rios, favorecendo a elevação das concentrações de partículas e, conseqüentemente, os cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* a elas associadas (ATHERHOLT et al., 1998; DAVIES et al., 2004; HELLER et al., 2006).

No período de águas, o aumento da turbidez da água associada à maior carga de sedimento coletado incrementa o número de (oo)cistos encontrados, o que vem confirmar uma queda na qualidade parasitológica da água de irrigação durante o período de maior pluviosidade.

A turbidez em si não traria inconvenientes sanitários, não fosse a natureza química de certas substâncias em suspensão que poderão estar presentes, bem como a ocorrência de organismos patogênicos associados a essas substâncias. Freqüentemente a matéria em suspensão atua como um protetor para os microrganismos patogênicos, protegendo-os da ação de agentes sanitizantes utilizados nas estações de tratamento, contribuindo assim para veiculação de doenças (VIANA, 2002).

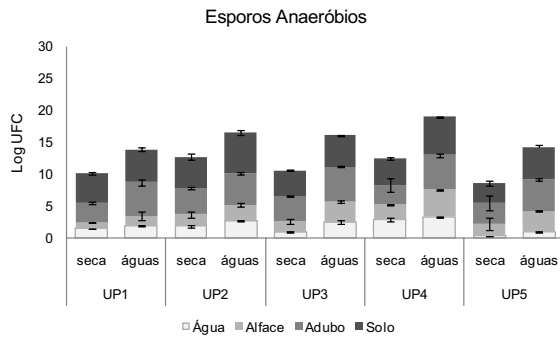
4.2.2. Parâmetros microbiológicos de qualidade na produção de alface

A avaliação da qualidade da água de irrigação, da alface, do adubo orgânico e do solo na produção de alface nas propriedades durante os períodos de seca e chuvas é apresentada na Figura 12.

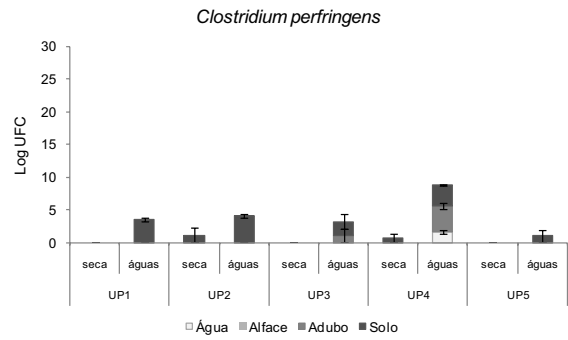
Observou-se que as amostras de água, alface, adubo e solo apresentaram presença de esporos anaeróbios com diferentes níveis de contaminação (Figura 12). Os maiores números desses microrganismos foram encontrados no adubo orgânico e no solo, com contagens máximas de $5,44 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ e de $6,27 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ durante o período de águas, respectivamente. Embora a presença dos esporos anaeróbios tenha sido detectada em todas as amostras de alface, essa contaminação não foi associada às outras fontes de contaminação avaliadas, como por exemplo, o adubo orgânico, o solo e ainda, a água de irrigação (Tabela 3). Já a contaminação do solo por esses mesmos microrganismos ocorreu devido à água utilizada na irrigação e ainda ao adubo orgânico misturado ao solo durante o cultivo (Tabela 4).

A alface apresenta microbiota natural que provém do ambiente, sendo influenciada pela estrutura da planta, técnicas de cultivo, transporte e armazenamento. Conseqüentemente, a microbiota encontrada na fonte de produção é constituída tipicamente por microrganismos que não são patogênicos para o homem. No entanto, mudanças em práticas agrônômicas ou de processamento, preservação, embalagem, distribuição e comercialização dos alimentos têm sido responsabilizadas pelo aumento no número de surtos e, ou infecções causadas por patógenos veiculados por vegetais. Tais alterações incluem o uso de esterco animal não submetido a compostagem como fertilizante e o uso de esgoto ou de água de irrigação não-tratada, as quais podem contribuir para a contaminação do alimento por patógenos ainda no campo (BEUCHAT, 2002).

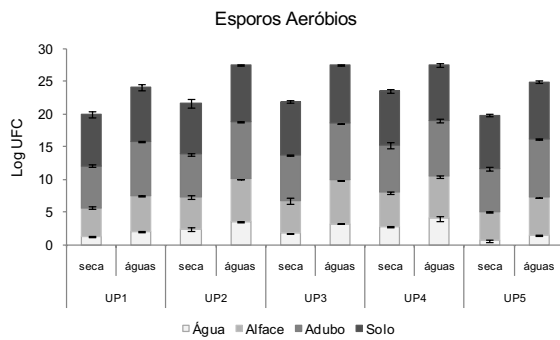
A presença de *C. perfringens* foi constatada na água usada para a irrigação proveniente do córrego apenas no período das águas, enquanto que nenhuma amostra de alface apresentou contaminação por esse patógeno (Figura 12). Apenas os adubos orgânicos utilizados nas unidades produtoras 3 e 4, ambos no período de águas, apresentaram contagens médias de $1,00 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ e $4,00 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. As maiores contaminações foram determinadas no solo (Figura 12), sendo que as mesmas não foram associadas com a contaminação da água nem do adubo orgânico (Tabela 4), já que *C. perfringens* fazem parte da sua microbiota natural.



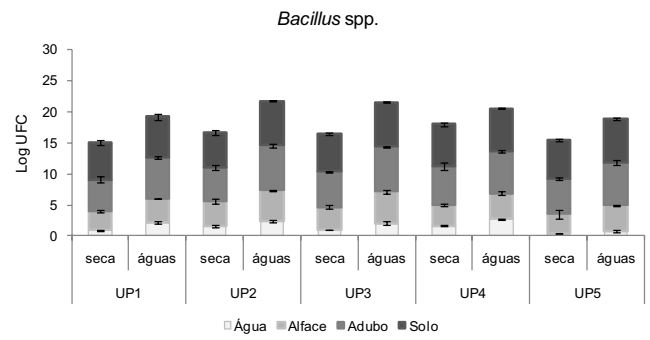
Água = log UFC(100 mL)⁻¹; Alfaca, Adubo e Solo = log UFC:g⁻¹



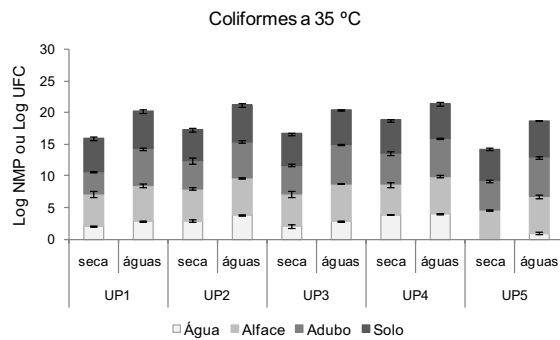
Água = log UFC(100 mL)⁻¹; Alfaca, Adubo e Solo = log UFC:g⁻¹



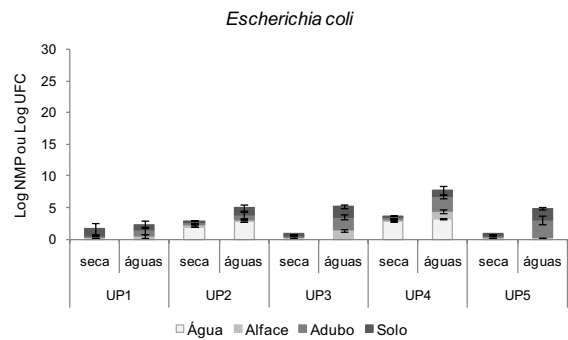
Água = log UFC(100 mL)⁻¹; Alfaca, Adubo e Solo = log UFC:g⁻¹



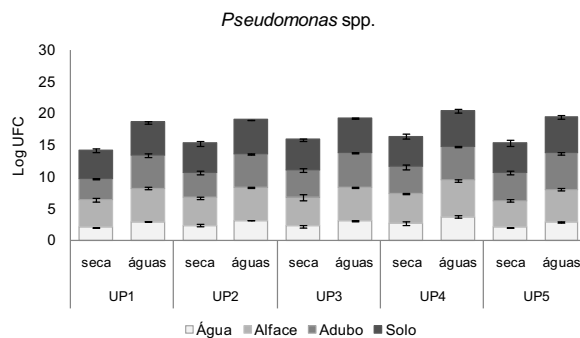
Água = log UFC(100 mL)⁻¹; Alfaca, Adubo e Solo = log UFC:g⁻¹



Água = log NMP(100 mL)⁻¹; Alfaca, Adubo e Solo = log UFC:g⁻¹



Água = log NMP(100 mL)⁻¹; Alfaca, Adubo e Solo = log UFC:g⁻¹



Água = log UFC(100 mL)⁻¹; Alfaca, Adubo e Solo = log UFC:g⁻¹

Figura 12 - Qualidade bacteriológica de amostras de água, alface, adubo orgânico e solo coletadas nas unidades produtoras (UP) de alface em períodos de seca e águas.

Tabela 3 - Estimativas das equações de regressão da contaminação bacteriológica de alface em função das contaminações da água de irrigação, do adubo orgânico e do solo utilizados nas diferentes unidades produtoras de alface

Microrganismo	Equação de Regressão	R ² (%)
Esporos anaeróbios	$\bar{Y} = 2,36$	-
<i>Clostridium perfringens</i>	$\bar{Y} = 0$	-
Esporos aeróbios	$\hat{Y} = 0,519 + 0,341*AG + 0,541*AD$	83,28
<i>Bacillus spp.</i>	$\bar{Y} = 3,98$	-
Coliformes a 35 °C	$\hat{Y} = 2,873 + 0,477*AD$	74,30
<i>Escherichia coli</i>	$\bar{Y} = 0,53$	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	$\hat{Y} = 2,426 + 0,912*AG$	97,00

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05)

\hat{Y} = log UFC·g⁻¹; \bar{Y} = Média do log UFC·g⁻¹; AG = microrganismo avaliado na água; AD = microrganismo avaliado no adubo orgânico.

Tabela 4 - Estimativas das equações de regressão da contaminação bacteriológica do solo em função das contaminações da água de irrigação e do adubo orgânico utilizados nas diferentes unidades produtoras de alface

Microrganismo	Equação de Regressão	R ² (%)
Esporos anaeróbios	$\hat{Y} = 1,627 + 0,0,410*AG + 0,566*AD$	78,00
<i>Clostridium perfringens</i>	$\bar{Y} = 1,58$	-
Esporos aeróbios	$\hat{Y} = 5,699 + 0,343*AD$	82,00
<i>Bacillus spp.</i>	$\hat{Y} = 2,369 + 0,670*AD$	90,00
Coliformes a 35 °C	$\bar{Y} = 5,38$	-
<i>Escherichia coli</i>	$\bar{Y} = 0,87$	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	$\hat{Y} = 2,434 + 0,302*AG + 0,386*AD$	96,00

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05)

\hat{Y} = log UFC·g⁻¹; \bar{Y} = log UFC·g⁻¹; AG = microrganismo avaliado na água; AD = microrganismo avaliado no adubo orgânico.

Esporos aeróbios e de *Bacillus spp.* foram encontrados em todas as amostras em ambos períodos avaliados (Figura 12). Constatou-se que a contaminação da alface por esporos aeróbios ocorreu devido às contaminações provenientes da água e do adubo orgânico e não do solo utilizado durante o cultivo (Tabela 3). No entanto, água e adubo não foram fontes de contaminação de *Bacillus spp.* em alface (Tabela 3). O

adubo foi o principal responsável pela presença de esporos aeróbios e *Bacillus* spp. no solo (Tabela 4).

A Resolução nº 357/MMA (BRASIL, 2005) e a Resolução nº 12/MS (BRASIL, 2001) não estabelecem limites ou índices máximos para contagem de coliformes a 35 °C para água de irrigação e hortaliças consumidas cruas, respectivamente. Porém, a presença desses microrganismos pode indicar condições higiênicas insatisfatórias. Foi verificada a presença de coliformes a 35 °C em todas as amostras de água, com exceção da água proveniente do poço artesiano (UP5) na época de seca (Figura 12). A água da mina (UP2) que era bombeada para o tanque de alvenaria antes da irrigação e do córrego (UP4) foram as que apresentaram maiores números de coliformes a 35 °C e *E. coli*, expressos em $\log \text{NMP} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$, principalmente na época das águas (Figura 12). As alfaces produzidas em todas as unidades produtoras apresentaram contaminações por coliformes a 35 °C que variaram entre 4,68 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ e 5,05 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ na seca e entre 5,70 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ e 5,94 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ no período de águas. As alfaces mais contaminadas com *E. coli* eram produzidas nas unidades produtoras 3 e 4 (Figura 12). A Tabela 3 mostra que a contaminação da alface por coliformes a 35 °C foi proveniente principalmente do adubo orgânico. Os maiores riscos de contaminação de hortaliças consumidas cruas estão nas práticas de agricultura que envolve adubos de origem animal e vegetal. A situação é mais séria nos países menos desenvolvidos, onde o uso de adubos naturais ou parcialmente tratados é comum e o risco é maior nos vegetais que crescem junto ao solo (LIMA, 2009).

Todas as amostras de solo apresentaram números elevados de coliformes a 35 °C em ambos os períodos e essa contaminação foi proveniente da microbiota natural do mesmo (Tabela 4). O solo possui outros fatores, além de sua composição natural, que favorecem a sobrevivência de inúmeros microrganismos como umidade, temperatura e pH (LIMA, 2009). Sendo *E. coli* considerada como o indicador fecal recente mais específico e de eventual presença de microrganismos patogênicos, os resultados de contaminação de adubo era esperado uma vez que é adicionado ao plantio sem o cumprimento do tempo mínimo de compostagem.

Foram encontradas células de *Pseudomonas* spp. em todos os tipos de amostras e em ambos os períodos (Figura 12). Possivelmente, as contagens que variaram de 4,23 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ durante a seca a 5,76 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ nas águas em alface ocorreram devido a contaminação da água de irrigação (Tabela 3). Além dessa fonte de contaminação, já foi constatado que bactérias do gênero *Pseudomonas* fazem parte

da microbiota natural da alface (BRACKETT, 1997; PORTE e MAIA, 2001; HEATON e JONES, 2008). Os autores dessas pesquisas relataram que *Pseudomonas* são as principais bactérias responsáveis pela deterioração de folhas de alface principalmente por serem psicrotróficas, possuírem crescimento rápido, serem produtoras de enzimas pectinolíticas que provocam a destruição dos tecidos e conseqüentemente, a deterioração da hortaliça. Avaliando-se a contaminação do solo, foi possível observar que *Pseudomonas* spp. foram provenientes tanto da água quanto do adubo orgânico (Tabela 4).

As influências de variações climáticas sobre a presença dos microrganismos, onde incluem bacterias e protozoários, em alface, água, adubo e solo também foram observadas nesse estudo. Observou-se que houve diferença ($P < 0,05$) entre a presença de todos os microrganismos avaliados nos períodos de seca e de águas. Assim, em todas as unidades produtoras foram encontradas maiores contaminações durante a época de maior pluviosidade (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias do número total de microrganismos (NTM), protozoários e bactérias, em água de irrigação, expressas em $\log \text{NTM}:(100 \text{ mL})^{-1}$, avaliados em diferentes unidades produtoras (UP) de alface nos períodos de seca e águas

Unidade Produtora	Períodos	
	Seca	Águas
UP 1	0,89 c B	1,32 c A
UP 2	1,43 b B	2,03 b A
UP 3	0,86 c B	1,51 c A
UP 4	2,04 a B	2,81 a A
UP 5	0,37 d B	0,76 d A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelos testes de Tukey e F ($P > 0,05$), respectivamente.

Foi possível classificar as unidades produtoras de acordo com as contaminações microbiológicas da água de irrigação. Dessa forma, constataram-se maiores contaminações da água na unidade produtora que utilizava água do córrego (UP4) para irrigação das hortaliças. A água proveniente do poço semi-artesiano (UP1) que armazenava a água no tanque de fibra de vidro e a água da nascente (UP3) apresentaram níveis de contaminação semelhantes. Enquanto que a unidade produtora

que utilizava água de poço artesiano (UP5) continha as menores médias gerais de microrganismos, o que permite classificá-la como a melhor fonte de água para a irrigação de alface nesse estudo (Tabela 5).

4.3. Correlação entre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., diferentes parâmetros bacteriológicos e turbidez

Na Tabela 6, é apresentada a correlação entre os protozoários avaliados e os parâmetros microbiológicos de água, alface, adubo e solo, e ainda, turbidez da água nas diferentes propriedades. A associação entre os parâmetros de qualidade da água com a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. é um subsídio para prever a sua ocorrência no ambiente e, com isso, orientar quanto aos procedimentos preventivos que devem ser empregados.

Constataram-se, na água de irrigação (Tabela 6), correlações altas entre ambos protozoários ($r = 0,98$), entre protozoários e *C. perfringens* (*Cryptosporidium*: $r = 0,81$; *Giardia*: $r = 0,78$) e, ainda, entre protozoários e turbidez (*Cryptosporidium*: $r = 0,76$; *Giardia*: $r = 0,78$).

Altherholt et al. (1998) também identificaram correlação positiva entre *Cryptosporidium* spp. e *Clostridium perfringens* em água. O grupo das bactérias anaeróbias, especificamente o *Clostridium perfringens*, tem sido bastante estudado como indicadores de contaminação ambiental mais remota, onde outros indicadores de menor resistência não seriam encontrados. O monitoramento deste indicador fornece subsídios para avaliar a eficiência da remoção de organismos patogênicos resistentes, como os protozoários (SCHIJVEN et al., 2002; BASTOS et al., 2004; SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006).

Um dado interessante foi a existência de associação estatisticamente significativa entre ambos os protozoários na água e a turbidez (Tabela 6). Conforme descrito no trabalho de Altherholt et al. (1998), os períodos chuvosos aumentaram as concentrações de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. na água bruta, primariamente por afetarem a turbidez, por meio da ressuspensão dos sedimentos ou suspensão de solo e matéria fecal antiga. Ainda vale ressaltar que a maioria dos casos de surtos de criptosporidiose nos EUA esteve acompanhada de picos de turbidez na água (SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996).

Tabela 6 - Resultados das análises de correlação, pelo teste de *Pearson*, entre *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., parâmetros microbiológicos e turbidez avaliados em água de irrigação, alface, adubo, solo proveniente das unidades produtoras

Parâmetros	Coeficiente de <i>Pearson</i> (r)			
	Água	Alface	Adubo	Solo
<i>Cryptosporidium</i> spp. x <i>Giardia</i> spp.	0,98**	0,97**	-0,06	0,82**
<i>Cryptosporidium</i> spp. x Esporos anaeróbios	0,63**	0,48**	-0,17	0,05
<i>Cryptosporidium</i> spp. x <i>C. perfringens</i>	0,81**	0,00	0,00	0,00
<i>Cryptosporidium</i> spp. x Esporos aeróbios	0,57**	0,24	-0,15	0,28
<i>Cryptosporidium</i> spp. x <i>Bacillus</i> spp.	0,46**	-0,07	-0,08	0,36*
<i>Cryptosporidium</i> spp. x Coliformes a 35 °C	0,55**	0,09	-0,02	0,10
<i>Cryptosporidium</i> spp. x <i>E. coli</i>	0,65**	0,34*	-0,05	0,40*
<i>Cryptosporidium</i> spp. x <i>Pseudomonas</i> spp.	0,47**	0,36*	-0,08	0,27
<i>Cryptosporidium</i> spp. x Turbidez	0,76**	-	-	-
<i>Giardia</i> spp. x Esporos anaeróbios	0,66**	0,45**	0,06	0,05
<i>Giardia</i> spp. x <i>C. perfringens</i>	0,78**	0,00	-0,07	0,02
<i>Giardia</i> spp. x Esporos aeróbios	0,57**	0,22	0,23	0,25
<i>Giardia</i> spp. x <i>Bacillus</i> spp.	0,45**	-0,11	0,25	0,38*
<i>Giardia</i> spp. x Coliformes a 35 °C	0,55**	0,00	0,14	0,22
<i>Giardia</i> spp. x <i>E. coli</i>	0,60**	0,30	0,19	0,49**
<i>Giardia</i> spp. x <i>Pseudomonas</i> spp.	0,49**	0,35	0,30	0,36*
<i>Giardia</i> spp. x Turbidez	0,78**	-	-	-

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t (P < 0,01)

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05)

Com relação aos indicadores bacterianos de contaminação fecal, coliformes a 35 °C e *E. coli*, não foi verificada correlação elevada com a ocorrência de protozoários na água (Tabela 6). Esse resultado retorna a discussão sobre as limitações desses grupos bacterianos que reconhecidamente, são insuficientes para testar a ausência de protozoários na água (NIEMINSKI e ONGERTH, 1995, GAMBÁ et al., 2000). É importante ressaltar que o uso do grupo “coliformes” como indicadores da qualidade da água para consumo humano, no que tange a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia*, tem sido muito questionado devido ao fato de que as bactérias são organismos menos resistentes ao processo de cloração do que os protozoários em questão. Ressalte-se que vários surtos de criptosporidiose ocorreram nos Estados Unidos e foram associados à água de consumo humano, apesar da mesma atender aos padrões bacteriológicos vigentes naquele país (KRAMER et al, 1996. SAVICHTCHEVA e

OKABE, 2006). Craun et al. (1997) avaliaram alguns surtos de veiculação hídrica nos Estados Unidos, envolvendo vários patógenos e ressaltaram que os coliformes são indicadores para bactérias e vírus, porém, não para os protozoários.

As demais associações, mesmo quando significativas, apresentaram correlações muito baixas ou não representaram boas correlações entre protozoários e bactérias em água (Tabela 6). Esses resultados parecem sugerir que esporos anaeróbios, esporos aeróbios, *Bacillus* spp., coliformes a 35 °C e *Pseudomonas* spp. não foram adequados para avaliação da qualidade parasitológica da água de irrigação nesse experimento.

Houve elevada correlação entre oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em alface ($r = 0,97$) e no solo ($r = 0,82$). Porém, todos os outros parâmetros microbiológicos estudados em alface, adubo orgânico e solo apresentaram baixa ou nenhuma correlação com ambos os protozoários (Tabela 6).

Outros trabalhos ainda deverão ser realizados para verificar a eficiência de um bom indicador da presença de protozoários em amostras de água, alface, adubo orgânico e solo, o que auxiliaria na indicação dos pontos em que a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. deveria ser prioritariamente realizada.

4.4. Teste do desafio microbiológico

O teste do desafio microbiológico pode ser realizado com microrganismos de interesse. Nessa pesquisa foram utilizados oocistos de *C. parvum*. Esse protozoário foi escolhido por ter sido detectado em amostras de alface que foram irrigadas com água de córrego. Para tornar a microbiota da alface em condições mais próximas da realidade, avaliaram-se células de *Pseudomonas fluorescens* juntamente com os oocistos de *C. parvum*. Essa bactéria foi escolhida pelo fato de ter sido encontrada em alfaces provenientes de todas as propriedades avaliadas em concentrações em torno de $5 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$. Além disso, *P. fluorescens* faz parte da microbiota natural da alface, são as principais responsáveis pela deterioração dessa hortaliça e possuem boa capacidade de adesão em superfícies de alimentos.

Os resultados mostraram que não houve diferença ($P > 0,05$) entre o número de reduções decimais (RD) de oocistos de *C. parvum* em culturas pura e mista.

As soluções surfactantes avaliadas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) nas médias das RD de oocistos de *C. parvum* e de *P. fluorescens* em cupons de folhas de alface. Verificou-se que o dodecil sulfato de sódio foi o surfactante mais

eficiente quanto à remoção de oocistos de *C. parvum* aderidos em cupons de alface, apresentando média geral de RD de 0,98 log oocistos·cm⁻² (Tabela 7). No entanto, ao se avaliar o número de RD de *P. fluorescens*, observou-se que, além do dodecil sulfato de sódio, o cloreto de benzalcônio (P > 0,05) também foi responsável pela maior redução decimal sobre as células bacterianas nas condições avaliadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Médias gerais do número de reduções decimais da população de oocistos de *C. parvum*, expresso em log oocistos·cm⁻², e da população de células de *P. fluorescens*, expresso em log UFC·cm⁻², aderidos em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão, após a aplicação dos surfactantes Cloreto de Benzalcônio, Tween 80 e Dodecil sulfato de sódio

Surfactante	Reduções Decimais	
	<i>C. parvum</i> (log oocistos·cm ⁻²)	<i>P. fluorescens</i> (log UFC·cm ⁻²)
Cloreto de Benzalcônio	0,69 b B	1,56 a A
Tween 80	0,39 c B	0,65 b A
Dodecil Sulfato de Sódio	0,98 a B	1,20 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelos testes de Tukey e F (P > 0,05), respectivamente.

Ao se avaliar cada surfactante separadamente, observou-se que o número de RD de *P. fluorescens* foi sempre superior ao de *C. parvum* (Tabela 7). Esse resultado pode ser associado ao fato de as células bacterianas terem aderido sempre em maior quantidade quando comparadas ao número de oocistos aos cupons de alface (Tabela 8). Diferentemente dos oocistos, essa maior capacidade de adesão das bactérias deve-se, entre outros fatores, à presença de apêndices celulares e de substâncias poliméricas extracelulares sintetizadas pelas bactérias, como é o caso de *P. fluorescens*, com a finalidade de facilitar a fixação das células à superfície de contato (TRACHOO, 2003).

Segundo McDonnell e Russel (1999), os compostos quaternários de amônio, como, por exemplo, o cloreto de benzalcônio, são capazes de danificar a membrana externa de bactérias Gram-negativas e, conseqüentemente, promoverem a liberação de constituintes intracelulares o que provoca a morte celular. Esses conhecimentos sobre o modo de ação dos compostos quaternários de amônio podem justificar as

propriedades antibacterianas do cloreto de benzalcônio e, dessa forma, explicar os números de RD encontrados nesse estudo.

Tabela 8 - Médias da população de oocistos de *C. parvum* em cultura pura e mista, expressas em log oocistos.cm⁻² e da população de células de *P. fluorescens* em cultura mista, expressas em log UFC.cm⁻², aderidos por 12 h em água peptonada 0,1% a 25 °C, em cupons de alface cultivar Vitória de Santo Antão, sem tratamento com surfactante

Microrganismo	Tipo de cultura	Média populacional (log oocistos.cm ⁻² ou log UFC.cm ⁻²)
<i>C. parvum</i>	Pura	1,88
<i>C. parvum</i>	Mista	3,78
<i>P. fluorescens</i>	Mista	5,63

Apesar da aplicação do dodecil sulfato de sódio ter sido eficiente para a remoção de células aderidas de *P. fluorescens*, há uma preocupação com relação ao seu efeito antimicrobiano. Filoche et al. (2004) demonstraram que a utilização desse surfactante em concentração de 1000 mg·L⁻¹ em procedimentos de higienização de placas de vidro com células bacterianas aderidas de três diferentes espécies foi eficiente. Porém, esses autores constataram que as células desprendidas da superfície após o uso do surfactante permaneciam viáveis, podendo aderir novamente à superfície de contato. Esses dados sugerem que um agente antimicrobiano efetivo necessita possuir capacidade de inativar agregados de células aderidas em um curto tempo de exposição para minimizar o reestabelecimento dos processos de adesão.

Outros estudos foram realizados a respeito do controle de bactérias aderidas em outras superfícies por dodecil sulfato de sódio. Simões et al. (2006) verificaram um baixo efeito desse surfactante, independente da concentração utilizada, visto que se obteve remoções menores que 30% de células de *P. fluorescens* aderidas na forma de biofilme em superfície de aço inoxidável. Entretanto, Azeredo et al. (2003) constataram uma boa capacidade de higienização de dodecil sulfato de sódio sobre células de *P. fluorescens*, também na forma de biofilmes, em superfícies de vidro. Segundo esses pesquisadores, a eficiência da remoção de células bacterianas aderidas ocorreu devido a alterações nas propriedades da parede celular da bactéria que foram provocadas por esse surfactante.

No caso da aplicação de Tween 80 nos cupons de alface, observou-se que as médias das RD de ambos os microrganismos foram diferentes e inferiores aos demais tratamentos (Tabela 7). Esses resultados mostram que as soluções de Tween 80 nas concentrações avaliadas não são recomendáveis quando se avalia a remoção de microrganismos aderidos em alface. De acordo com Prevost et al. (2003), o uso de surfactantes como Tween 80 pode remover parte da população de células bacterianas que estejam aderidas na forma de biofilmes. No entanto, o uso desse surfactante sozinho não inativa efetivamente a bactéria e o protozoário avaliados nesse experimento.

Algumas justificativas são dadas para explicar o modo de ação de alguns surfactantes sobre a remoção de oocistos de *C. parvum*. Segundo Smith e Rose (1990), a interação não covalente entre a superfície negativamente carregada do oocisto é reduzida pela adição de soluções detergentes como Tween 80 e dodecil sulfato de sódio que reduzem agregações e mantêm os oocistos como organismos individuais, o que facilita a remoção dos mesmos.

A falta de eficiência do produto químico usado para descontaminar a superfície de alfaces cruas tem sido amplamente atribuída à incapacidade dos componentes ativos da solução em inibir ou inativar as células microbianas. Outros fatores como a concentração do produto e o tempo de contato com a superfície a ser descontaminada, também contribuem para a eficiência do processo de higienização (BEUCHAT, 2002).

Foram constatadas diferenças no número de RD de *C. parvum* e de *P. fluorescens* entre as concentrações dos três surfactantes ($p < 0,05$) e de *P. fluorescens* entre as concentrações de cloreto de benzalcônio. O número de RD de *C. parvum*, expresso em log de oocistos·cm⁻², em culturas pura e mista e de *P. fluorescens*, expresso em log UFC·cm⁻² em cultura pura, em função da concentração dos surfactantes estão representados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

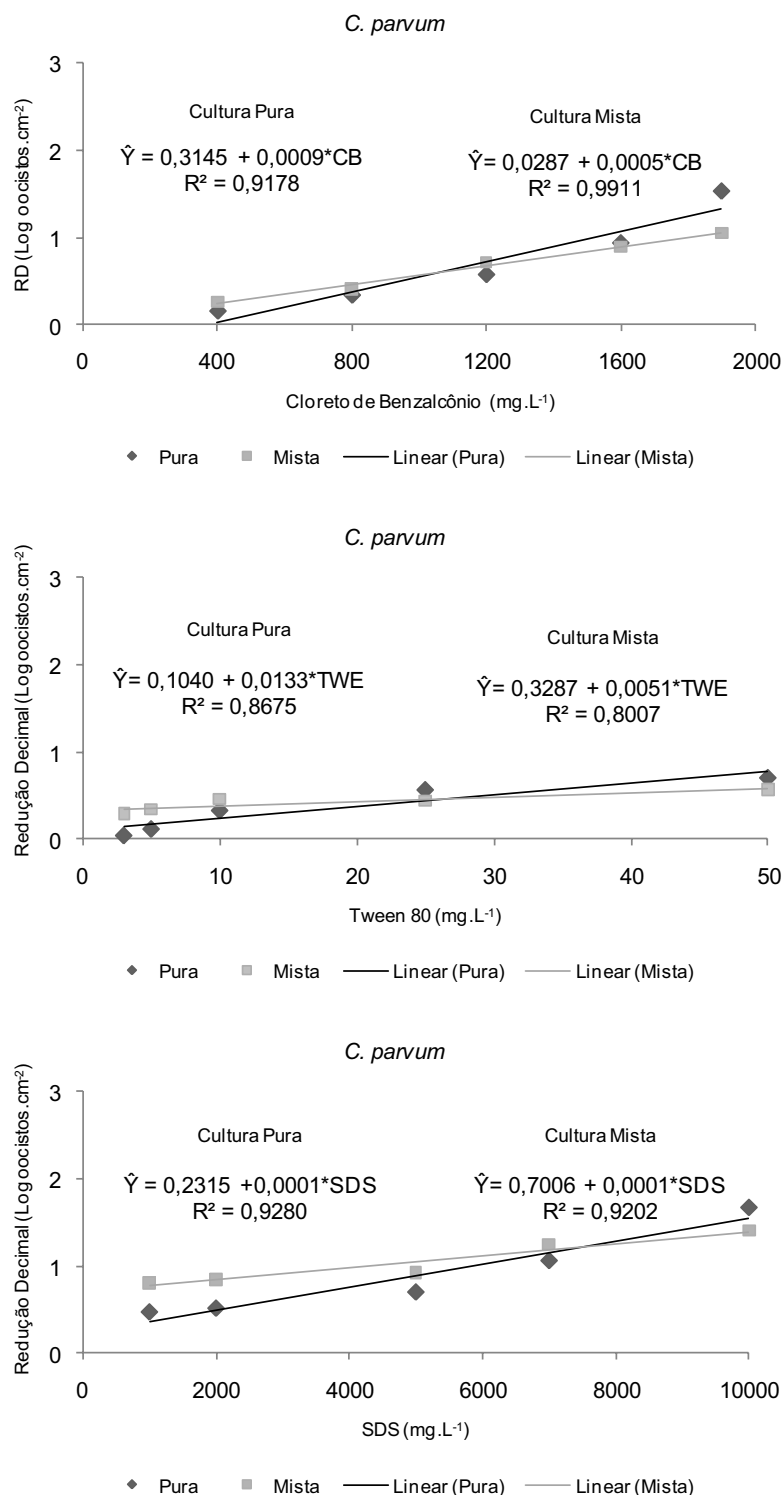


Figura 13 - Redução decimal (RD) de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, expresso em log oocistos.cm⁻², em culturas pura e mista com *Pseudomonas fluorescens*, aderidos em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão, após tratamentos por 10 min de contato com diferentes concentrações de Cloreto de Benzalcônio (CB), Tween 80 (TWE) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05).

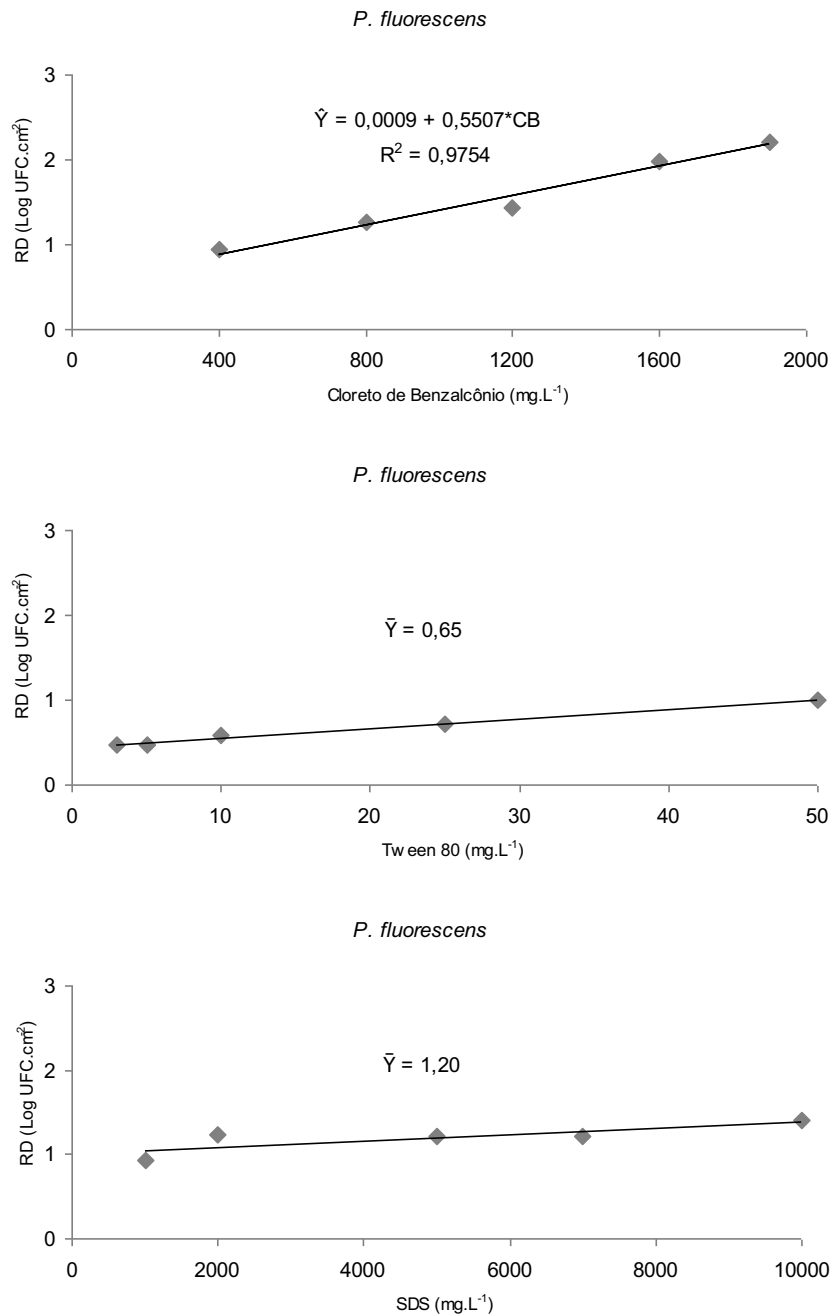


Figura 14 - Redução decimal (RD) de *Pseudomonas fluorescens*, expresso em log UFC·cm⁻², aderidas em cupons de alface lisa, cultivar Vitória de Santo Antão, após tratamentos por 10 min de contato com diferentes concentrações de Cloreto de Benzalcônio (CB), Tween 80 (TWE) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05).

A eficiência na remoção de oocistos e de células bacterianas indicou uma relação direta entre o número de RD e a concentração de surfactante. Observou-se, em geral, que a redução das populações de *C. parvum* após a aplicação de todos os

surfactantes (Figura 13) e de *P. fluorescens* após a aplicação de cloreto de benzalcônio (Figura 14) aumentou significativamente ($P < 0,05$) com a concentração de cada tipo de surfactante independente do tipo de cultura, pura ou mista. Assim, quando se utilizou a solução de cloreto de benzalcônio a $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foi possível obter, em média, reduções de 0,16, 0,26 e 0,94 ciclos log de *C. parvum* em cultura pura (Figura 13), *C. parvum* em cultura mista (Figura 13) e *P. fluorescens* em cultura mista (Figura 14), respectivamente. Enquanto que em concentração de $1900 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, atingiram-se reduções de 1,54, 1,05 e 2,21 ciclos log nos mesmos tipos de cultura citados anteriormente. Esses resultados demonstram a maior eficiência desse surfactante para a retirada de ambos os microrganismos em concentração mais elevada, a qual se encontra mais próxima de sua concentração micelar crítica ($\text{CMC} = 1876 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Dessa forma, sugere-se utilizar a solução de cloreto de benzalcônio na concentração de $1900 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para a melhor eficiência na remoção de oocistos de *C. parvum* e de células de *P. fluorescens* aderidos em alface. No entanto, são necessários estudos toxicológicos para avaliar a possibilidade de efeito nocivo desse produto, principalmente na concentração sugerida.

Observou-se que o número de RD de oocistos de *C. parvum* continuavam a aumentar mesmo em valores acima da CMC dos surfactantes Tween 80 ($\text{CMC} = 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e dodecil sulfato de sódio ($\text{CMC} = 2310 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Em valores maiores ou iguais a CMC, a tensão superficial estará reduzida ao máximo, o que poderá refletir na maior molhabilidade da superfície da alface e, conseqüentemente, na maior remoção de microrganismos a ela aderidos.

Contudo, o efeito da redução populacional de *P. fluorescens* por Tween 80 e dodecil sulfato de sódio não foi dependente da concentração desses surfactantes (Figura 14). Como o uso do dodecil sulfato de sódio foi mais eficiente do que o uso do Tween 80 e como não houve diferença de RD entre as diferentes concentrações utilizadas, pode-se sugerir a utilização de uma concentração mais baixa, como $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de dodecil sulfato de sódio, para a remoção de células de *P. fluorescens* aderidas em alface. Porém, essa concentração não foi eficiente para remoção de *C. parvum*. Contudo, é importante a realização de estudos para avaliar o efeito toxicológico desse surfactante na concentração sugerida.

Ainda há escassez de trabalhos que relatam a eficiência de surfactantes sobre a remoção e, ou inativação de microrganismos aderidos em hortaliças. Sabe-se que alguns sanitizantes como compostos clorados e à base de ácido peracético, são

eficientes sobre a redução da população bacteriana de hortaliças. No entanto, não têm efeito sobre protozoários nas concentrações recomendadas. Desse modo, mais pesquisas devem ser desenvolvidas com essa finalidade de modo a oferecer informações sobre o tipo de produto químico, concentração ideal a ser utilizada, modo e tempo de aplicação, entre outros, para garantir a segurança alimentar na cadeia produtiva de hortaliças.

É importante ressaltar que no teste de exclusão microbiológica, realizado após o procedimento de higienização inicial, não foram encontrados os microrganismos avaliados nesse experimento. Dessa forma, as células de *P. fluorescens* e os oocistos de *C. parvum* foram provenientes da contaminação intencional.

5. CONCLUSÃO

Esse estudo revelou informações importantes relativas à qualidade parasitológica na produção de alface na região de Viçosa, MG. Constatou-se a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água de irrigação, alface, adubo orgânico e no solo em pelo menos uma unidade produtora, no período de seca e, ou de águas.

A qualidade parasitológica da água usada para irrigação foi determinante para a contaminação de alface por ambos os protozoários.

Os períodos de seca e de águas foram um dos principais fatores a influenciar a densidade e ocorrência desses protozoários principalmente em água proveniente de córrego e em alfaces irrigadas com essa fonte de abastecimento. Foi constatada também que a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água sofreu influência da turbidez e da pluviosidade.

As variações climáticas tiveram influência sobre a contaminação parasitológica e bacteriana de todas as amostras avaliadas. Em geral, foram constatadas menores contaminações no período de seca. A contaminação bacteriana de alface, principalmente com relação à presença de esporos aeróbios e coliformes a 35 °C, descreveu uma relação direta com a contaminação bacteriana proveniente do adubo orgânico utilizado no sistema de cultivo. Esses dados mostraram que o uso de adubo que não atenda o período de compostagem de quatro meses pode ser um problema na produção de alface.

Foram observadas correlações elevadas entre a ocorrência de ambos os protozoários em água, alface e solo. Na água também foram constatadas correlações altas entre protozoários e *C. perfringens*, e protozoários e turbidez. A presença de

Clostridium perfringens indica a contaminação fecal remota, onde outros indicadores de menor resistência (*E. coli*) não seriam encontrados.

Todos os outros parâmetros microbiológicos estudados em alface, adubo orgânico e solo apresentaram baixa ou nenhuma correlação com ambos os protozoários. Esses resultados indicam que alguns desses indicadores bacteriológicos não são preditivos para a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

O processo de detergência é importante para ser inserido como uma das etapas de higienização de folhas de alface. A capacidade de remoção de oocistos de *C. parvum* em cultura pura ou mista com *P. fluorescens* pelos surfactantes cloreto de benzalcônio, Tween 80 e dodecil sulfato de sódio é diretamente proporcional à concentração utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Principais síndromes infecciosas.** Módulo 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_1_2004.pdf> Acesso em: 01 mar 2009.

ATHERHOLT, T. B.; Le CHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; ROSEN, J. Effect of rainfall on *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, v. 90, p. 66-80, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. American Water Works, Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 21.ed. Washington, 566p. 2005.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium methods for the microbiological examination of foods.** 4^a ed. APHA, Washington, 676p., 2001.

ANTUNES, M. A. **Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos na cadeia de produção da alface (*Lactuca sativa* L.) variedade Vitória de Santo Antão.** Viçosa, MG: UFV, 2009. 171 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.

AZEREDO, J.; PACHECO, A. P.; LOPES, I.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA M. J. Monitoring cell detachment by surfactants in a parallel plate flow chamber. **Water Science and Technology**, v. 47, p. 77-82, 2003.

BASTOS, R. K. X.; HELLER, L; VIEIRA, M. B. C. M.; BRITO, L. L. A; BEVILACQUA, P. D.; NASCIMENTO, L. E. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts dynamics in southeast Brazil. Occurrence in surface water and removal in water treatment processes. **Water Science and Technology**, v. 14, p. 15 -22, 2004.

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, p. 492-495, 2004.

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

BRACKETT, R. E. Alteración microbiológicas y microorganismos patógenos de frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. In: WILEY, R.C. **Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas**. Zaragoza: Acribia. p. 263-304, 1997.

BRASIL - Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, condições e padrões de lançamento de efluentes**. Disponível em: < www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em: 06 ago. 2009.

BRASIL - Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. **Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 16 mai. 2009.

BRASIL - Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 01 jun. 2009.

CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H.; BETTINI, M. J. C. B.; MANGINI, A. C. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP- Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 89-91, 2001.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE-SES/SP. **Série histórica das doenças de transmissão hídrica e alimentar, Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/hidri_estat.html> Acesso em: 11 ago 2009.

COOK, N.; PATON, C. A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R. A. B.; BARKER, K.; SMITH, H. V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 215-221, 2006.

COULTER, J.B.S. Global importance of parasitic disease. **Current Paediatrics**, v. 12, p.523-533, 2002.

CRAUN, G. F.; BERGER, P. S.; CALDERON, R. Coliform bacteria and waterborne diseases outbreak. **Journal of the American Water Works Association**, v. 89, p. 96-104, 1997.

DAROLT, M. R. A qualidade dos alimentos orgânicos. **Conferência BioFach**, Rio de Janeiro, set. 2003. Disponível em: < <http://www.planetaorganico.com.br.html> >. Acesso em: 11 jun. 2009.

DAVIES, C.M.; FERGUSON, C.M.; KAUCNER, C.; KROGH, M.; ALTAVILLA, N.; DEERE D.A.; ASHBOLT, N. J. Dispersion and transport of *Cryptosporidium* oocysts

from fecal pat sunder simulated rainfall Events. **Applied And Environmental Microbiology**, v.70, p. 1151-1159, 2004.

DIAS, G. M. F.; BEVILACQUA, P. D.; BASTOS, R. K. X.; OLIVEIRA, A. A.; CAMPOS, G. M. M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1291-1300, 2008.

FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 41-43, 2002.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1305-1322, 2000.

FERGUSON, C. M.; COOTE, B. G.; ASHBOLT, N. J. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an stuarine system. **Water Research**, v. 30, p. 2045-2054, 1996.

FILOCHE, S. K.; ZHU, M.; WU, C. D. In situ Biofilm Formation by Multi-species Oral Bacteria Under Flowing and Anaerobic Conditions. **Journal of Dental Research**, v. 83, p. 802-806, 2004.

FOX, K. R.; LYTLE, D. A. Milwaukee's crypto outbreak: investigation and recommendations. **Journal of the American Water Works Association**, v. 88, p. 87-94. 1996.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, p. 36-43, 2007.

FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R.; BRANCO, N. Detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em água pela técnica de filtração em membrana: estudo comparativo entre diferentes técnicas de eluição. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, p. 205, 2001a.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 109-111, 2001b.

FUNCK, J. A. B.; SILVEIRA, F. O. Ésteres de ácidos graxos da margarina com sacarose e sua aplicação na tecnologia farmacêutica. Parte I. **Caderno de Farmácia**, v. 3, p. 13-28, 1987.

GAMBA, R. C.; CIAPINA, E. M.; ESPINDOLA, R. S.; PACHECO, A.; PELIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 151-153, 2000.

GONÇALVES, E. M. N.; SILVA, A.J.; EDUARDO, M. B.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a daycare unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, p.119-126. 2006.

HEALTH PROTECTION AGENCY. **Enumeration of *Clostridium perfringens* by membrane filtration. National Standard Method W 5.** Disponível em: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp> Acesso em: 15 jul. 2007.

HEATON, J. C.; JONES, K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 613-626, 2008.

HELLER, L.; VIEIRA, M. B. C. M.; BRITO, L. L. A.; SALVADOR, D. P. Desempenho da filtração lenta em areia submetida a cargas de pico de oocistos de *Cryptosporidium* sp, bactérias e sólidos: uma avaliação em instalação piloto. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, p. 27-38, 2006.

KORNACKI, J. L; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F. P., ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. APHA, cap. 8, p. 69-87, 2001.

KRAMER, M. H.; HERWALDT, B. L.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L.; JURANEK, D. D. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1993-1994. **MMWR Surveillance Summaries CDC**, v. 45, p. 1- 33, 1996.

KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D. R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures and soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2820-2826, 1999.

LABBE, R. G. *Clostridium perfringens*. In: DOWNES, F. P., ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. APHA, cap. 34, p. 325-330, 2001.

LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2610-2616, 1991.

LIMA, J. S. **Bioindicação em ecossistemas terrestres**. Disponível em: <<http://www.ietec.com.br/site/techoje/categoria/abrirPDF/173>> Acesso em: 10 ago. 2009.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-179, 1999.

MEDEMA, G. J.; SCHETS, F. M.; TEUNIS, P. F. M.; HAVELAAR, H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4460-4466, 1998.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo: Atheneu, 473 p. 2003.

NEWMAN, R. D.; ZU, S. X.; WUHI, T.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in urban community in northeast Brazil. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, p. 500-505, 1994.

NIEMINSKI, E. C.; ONGERTH, J. E. Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* conventional treatment and direct filtration. **Journal of the American Water Works Association**, v. 87, p. 90-106, 1995.

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

PACHECO, M. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CANDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H. S.; ARMELIN, J. M.; BERNARDES, R. Condições higiênicas-sanitárias de verduras e legumes comercializadas no Ceagesp de Sorocaba - SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, p. 50-51, 2002.

PORTE, A.; MAIA, L. H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, UFPR**, v. 19, p. 105-118, 2001.

PREVOST, A.; BARBEAU, J. COTE, L.; CHARLAND, R.; FAUCHER, E. Sinergistic detergent and disinfectant combinations for decontaminating biofilm-coated surfaces. **European Patent Specification**, n. 991262212.2, p. 1-7, 2003.

RÉ, A.L. **Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano do município de Araras – SP, com ênfase na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia lamblia***. São Paulo, SP: Universidade Presbiteriana Mackenzie, 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) – Universidade Mackenzie, 1999.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 301 p. 2001.

RICE, E. W.; FOX, K. R.; MILTNER, R. J.; LITTLE, D. A.; JOHNSON, C.H. Evaluating plant performance with endospores, **Journal of American Water Works Association**, v. 88, p. 112-130, 1996.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R. Determinação da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Química Nova**, v. 32, p. 518-521, 2009.

ROSE, J. B. Occurrence and significance of *Cryptosporidium* in water. **Journal of the American Water Works Association**, v. 80, p. 53-58, 1988.

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

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relation with pathogens and conventional indicator, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, v. 40, p. 2463-2476, 2006.

SCHIJVEN, J. F.; BRUIN, H. A. M.; HASSANIZADEH, S. M.; HUSMAN, A. M. R. Bacteriophages and *Clostridium* spores as indicator organisms for removal of pathogens by passage through saturated dune sand. **Water Research**, v. 37, p. 2186-2194, 2002.

SCHLUNDT, J., TOYOFUKU, H., JANSEN, J., HERBST, S. A. Emerging foodborne zoonoses. **Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Epizooties**, v. 23, p. 513-533, 2004.

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

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; MACHADO, I.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow generated biofilms with surfactants – Evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, p. 338-345, 2006.

SIVAPLASINGHAM, S.; FRIEDMAN, C. R.; COHEN, L.; TAUXE, R. V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2342-2353, 2004.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis. **Parasitology Today**, v. 6, p. 8-12, 1990.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Status. **Parasitology Today**, v. 14, p. 14-22, 1998.

SMITH, M. J.; FLOWERS, T. H.; COWLING, M. J.; DUNCAN, H. J. Method for the measurement of the diffusion coefficient of benzalkonium chloride. **Water Research**, v. 36, p. 1423-1428, 2002.

SOARES, B.; CANTOS, G. A. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 8, p. 377-384, 2005.

SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal of American Water Works Association**, v. 88, p.76-86, 1996.

SOUZA, J. L. Tomateiro para mesa em sistema orgânico. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, p.108-120, 2003.

STEVENSON, K. E., SEGNER, W. P. Mesophilic Aerobic Sporeformers. In: DOWNES, F. P., ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. APHA, cap. 22, p. 223-228, 2001.

STUKEL, T.; GREENBERG, E.; BRADLEY, D.; REED, F.; JACOBS, N. A longitudinal study of rainfall and coliform contamination in small community drinking water supplies. **Environmental Science & Technology**, v. 24, p. 1-5, 1990.

TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. H. P.; BERGAMINI, A. M.; OKINO, H. T.; SILVA, A. M. C.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 169-174, 2000.

TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. H. P.; BERGAMINI, A. M.; OKINO, H. T.; SILVA, A. M. C.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 37-41, 2001.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A. P.; WATT, S. E.; DOWD, R.; ENRIQUEZ, I. L.; PEPPER, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 378-382, 2002.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Journal of Science Technology**, v. 25, p. 807-815, 2003.

VIANA, M.R. **Hidráulica Aplicada às Estações de Tratamento de Água**. 4.ed. Belo Horizonte: Imprimatur Artes Ltda, 573 p. 2002.

VOLPE, P. L. O.; SILVA FILHO, E. A. Estudo microcalorimétrico da interação de tensoativos n-alquil-sulfato de sódio com tripsina a 298 k. **Química Nova**, v. 20, p. 150-153, 1997.

CAPÍTULO 3

Captura e retenção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em tubulação de PVC utilizada em irrigação de hortaliças folhosas

1. INTRODUÇÃO

A qualidade e segurança da água são questões preocupantes e demandam a atenção das autoridades de saúde pública. O crescimento populacional em todo o mundo, a necessidade de quantidades maiores de água, tanto pela indústria como para irrigação agrícola, exigem novas demandas de reservas de águas disponíveis. A água pode veicular enteroparasitas, indicando a inexistência ou a inadequação do tratamento de dejetos e da proteção aos mananciais de água potável (FRANCO, 2007).

Dentre os enteroparasitas veiculados pela água encontra-se o gênero *Cryptosporidium*. Várias espécies desse gênero foram descritas, mas somente *Cryptosporidium parvum* tem sido associado às doenças gastrointestinais (TEUNIS e HAVELAAR, 2002). A criptosporidiose pode ser fatal em pessoas imunocomprometidas e pode debilitar severamente indivíduos imunocompetentes. Outro agravante dá-se pelo fato de oocistos de *Cryptosporidium* serem resistentes às condições ambientais adversas, podendo sobreviver por vários meses no ambiente aquático e são também resistentes à concentração de cloro utilizada no tratamento convencional de água. Assim, uma das principais vias de transmissão do protozoário ocorre por meio da água, seja pelo uso de água superficial não tratada, por sistemas de distribuição contaminados ou tratamento inadequado (MULLER et al., 2000).

O transporte de oocistos de *C. parvum* pela água pode ser influenciado por interações com comunidades microbianas aderidas às superfícies, denominadas de biofilmes que, geralmente, possuem uma grande diversidade de espécies microbianas. No entanto, devido à sua maior versatilidade e resistência, as bactérias são os microrganismos predominantes. As bactérias devido às suas características de possuírem tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são dentre todos os microrganismos, consideradas como excelentes produtoras de biofilmes (CHARACKLIS, 1990).

As células bacterianas aderem firmemente a quase todas as superfícies imersas em solução aquosa. Estas células aderidas crescem, multiplicam-se e produzem substâncias poliméricas extracelulares, que se estendem para além da superfície das células, formando um emaranhado polimérico que envolve toda a biomassa aderida, sendo essa estrutura denominada de biofilme (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990; HALL-STOODLEY et al., 2004).

Dada a evidência que bactérias e outros microrganismos podem estar associados a biofilmes em sistemas de abastecimento de água, acredita-se que os oocistos de *C. parvum* também podem se associar a biofilmes (SKRABER et al., 2005).

A morfologia e as características físico-químicas dos biofilmes podem promover a deposição e retenção de oocistos de *C. parvum*. Os microrganismos podem ser transferidos do biofilme para o meio circundante. Como resultado dessa transferência, os biofilmes podem servir de reservatórios de doenças e os patógenos depositados podem ser liberados para o sistema de água pelo desprendimento dessa comunidade microbiana. Dessa forma, uma grande preocupação seria o desprendimento de oocistos de *C. parvum* dos biofilmes devido à sua resistência a condições ambientais típicas (LANGMARK et al., 2005).

O uso de sanitizantes químicos é uma das principais formas de controle de problemas associados com formação de biofilmes microbianos. Os surfactantes são comumente usados em formulações de produtos de higienização devido à capacidade de diminuir a tensão superficial dos líquidos, o que melhora a molhabilidade da superfície. Compostos de amônia quaternária como, por exemplo, o cloreto de benzalcônio, são classificados como surfactantes catiônicos e possuem boa capacidade de limpeza e propriedades antimicrobianas (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a capacidade de captura e de retenção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em tubulação de poli (cloreto de vinila) (PVC) utilizada em irrigação de hortaliças folhosas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de formação de biofilmes de *P. fluorescens* em tubulação de PVC;
- Avaliar a capacidade de adesão de oocistos de *C. parvum* em tubulação de PVC;
- Avaliar as interações entre biofilmes de *P. fluorescens* e oocistos de *C. parvum* aderidos em tubulação de PVC;
- Avaliar a influência da tensão superficial, da hidrofobicidade e da energia livre interfacial de adesão na formação de biofilmes de *P. fluorescens* e dos oocistos de *C. parvum* aderidos em tubulação de PVC.
- Avaliar a capacidade de remoção de cloreto de benzalcônio sobre biofilmes de *P. fluorescens* e oocistos de *C. parvum* aderidos em tubulação de PVC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, de Nanoscopia do Departamento de Física e no Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Microrganismo e preparo da suspensão bacteriana

O estudo de adesão e formação de biofilmes foi conduzido utilizando a estirpe de referência *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Essa cultura bacteriana foi mantida em tubos com tampa apegada (Eppendorf®) com capacidade de 1 mL, contendo BHI (OXOID®) e glicerol a 30% mantidos à temperatura de - 80 °C. Para o preparo da suspensão utilizada na formação dos biofilmes, a cultura foi ativada por três vezes consecutivas em caldo BHI e incubada a 26°C por 24 h. A cultura ativa foi centrifugada a 1900 x *g* por 10 minutos e os *pellets* foram lavados com água destilada esterilizada. A suspensão bacteriana foi preparada por ressuspensão dos *pellets* em água destilada esterilizada e inoculada em 600 mL de Meio Mínimo de Sais – MMS (K₂HPO₄: 7 g·L⁻¹; KH₂PO₄: 2 g·L⁻¹; MgSO₄·7H₂O: 0,2 g·L⁻¹; (NH₄)₂SO₄: 1 g·L⁻¹; glicerol: 4 g·L⁻¹ e CaCl₂: 1 mmol·L⁻¹) de modo a obter uma concentração de 10⁶ UFC·mL⁻¹, para cada sistema experimental.

3.2. Higienização de tubulação de Poli (cloreto de vinila), tampas rosqueáveis e mangueiras

Nesse estudo foi utilizada tubulação de poli (cloreto de vinila), PVC, que é usada no processo de irrigação de hortaliças. Assim, os reatores elaborados para a realização dos experimentos eram compostos por esse material, com comprimento de 23 cm e diâmetro de 4,6 cm utilizada na irrigação de hortaliças folhosas, tampas rosqueáveis furadas, tampas rosqueáveis sem furos e mangueiras de silicone com 80 cm de comprimento e diâmetro de 0,4 cm (Figura 1).

A higienização da tubulação e das tampas foi realizada à temperatura ambiente, seguindo-se os passos de: (i) pré-lavagem com água; (ii) lavagem com detergente neutro; (iii) enxágüe com água; (iv) imersão em solução clorada, a partir de hipoclorito de sódio (Unilever[®]), a 200 mg·L⁻¹ por 30 min; (v) imersão em solução de tiosulfato de sódio (Vetec[®]) a 0,5% por 10 min e (vi) imersão em água destilada esterilizada por 10 min.

A limpeza das mangueiras de silicone foi realizada seguindo-se os passos (i), (ii) e (iii) descritos acima. No entanto, a sanitização foi realizada por meio de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min.

3.3. Montagem do sistema para formação de biofilmes

Dois sistemas experimentais de circulação foram montados (Figura 2), utilizando-se duas bombas peristálticas (Modelo 77201-60, Easy-Load II, Masterflex[®]), sendo que 400 mL da suspensão bacteriana foram colocados dentro de cada um dos reatores de PVC, com área de 294 cm² e 200 mL foram adicionados a cada frasco de vidro, previamente esterilizado a 121 °C por 15 min, para circulação a 20 mL·min⁻¹ por 12 h por dia durante cinco dias. A cada 24 h, a suspensão de *P. fluorescens* em MMS utilizada para formação do biofilme foi trocada. Dessa forma, a inoculação da suspensão bacteriana foi realizada por cinco dias consecutivos para a formação do biofilme. Diariamente foi determinada a concentração bacteriana em MMS após 24 h de contato com os reatores. Esse procedimento foi realizado por meio de diluições do MMS circulado, seguida de plaqueamento em ágar Cetrimide (Himedia[®]) e incubação a 26 °C por 48 h.



Figura 1 - Composição dos reatores utilizados no experimento: (a) tubulação de poli (cloreto de vinila); (b) tampas rosqueáveis furadas; (c) tampas rosqueáveis sem furo; (d) mangueiras de silicone.



Figura 2 - Sistema experimental para formação do biofilme de *P. fluorescens* em meio mínimo de sais, por cinco dias consecutivos, a 25 °C.

3.4. Inoculação de *Cryptosporidium parvum*

Para avaliação da capacidade de captura e de retenção de oocistos pelo biofilme de *P. fluorescens*, foram utilizados oocistos de *C. parvum*. Essa espécie de protozoário foi isolada de bezerros recém-nascidos infectados e adquirida da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba/MG. Os oocistos foram mantidos sob refrigeração e encontravam-se em suspensão com concentrações de 1×10^8 oocistos·10 mL⁻¹ em solução de tampão fosfato (PBS), estreptomicina, penicilina e Tween 20 a 0,01%.

Após cinco dias de formação do biofilme de *P. fluorescens*, oocistos de *C. parvum* foram inoculados em 600 mL de MMS de modo a obter concentrações de 10^4 oocistos·mL⁻¹, em cada sistema experimental. Da mesma forma realizada com a suspensão bacteriana, 400 mL de suspensão de oocistos foram adicionados a cada reator e 200 mL foram adicionados a cada frasco de vidro, utilizado para circulação. A suspensão do protozoário foi circulada por 12 h a $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e mantida em repouso por 12 h para avaliação da captura de oocistos pelo biofilme formado em ambos reatores. A fim de avaliar a retenção dos oocistos pelo biofilme de *P. fluorescens*, realizou-se um aumento do fluxo para $120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ por 1 h. Para avaliação da capacidade de adesão de oocistos de *C. parvum* na tubulação de PVC, sem o auxílio do biofilme, outro experimento foi realizado somente com circulação de suspensão do protozoário em concentrações de 10^4 oocistos·mL⁻¹ a $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ por 12 h, seguido de repouso por mais 12 h, por um dia e posterior aumento do fluxo em um dos reatores para $120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ por 1 h.

3.5. Quantificação do biofilme de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum* capturados e retidos

A suspensão de microrganismos em MMS foi retirada de cada reator. Foram colocadas tampas sem furo nas tubulações onde foi realizada uma rinsagem com 400 mL de água destilada esterilizada por um minuto para retirada de células planctônicas. Após a retirada da solução de rinsagem, as tubulações foram preenchidas com 100 mL de solução de eluição, composta por 100 mL de solução de Tween 80 a 1 %, 0,1 mL de emulsão anti-espumante (Anti-Foam A, Sigma Aldrich®) e 1000 mL de água destilada (q. s. p). As tampas e os conectores superiores foram retirados dos reatores e as

células aderidas, removidas das paredes dos tubos usando-se uma haste de aço inoxidável (Figura 3a) com 37 cm de comprimento, tendo em uma das extremidades um disco de neopreno com 4,6 cm de diâmetro (GILMOUR et al., 1993). O disco de neopreno apresentava quatro orifícios de 0,5 cm de diâmetro cada, distribuídos um em cada quadrante, uniformemente, para passagem da solução de eluição (Figura 3b).

Essa haste foi empurrada até o fundo da tubulação por seis vezes seguidas em movimentos de cima para baixo (Figura 4a e 4b). A tubulação foi fechada para que a solução de eluição permanecesse em contato com a superfície por um minuto e, então, as células bacterianas sésseis e oocistos capturados e retidos pelos biofilmes fossem quantificados.

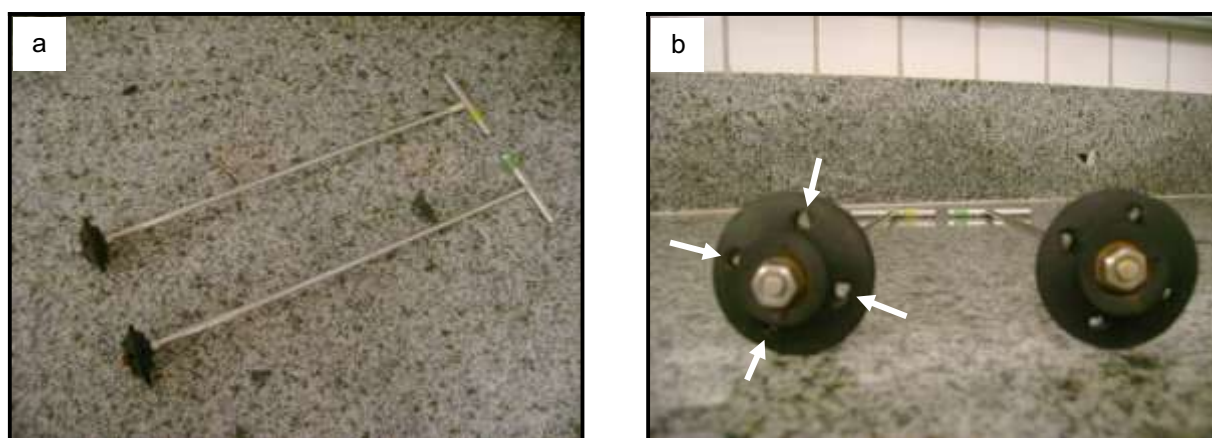


Figura 3 – Composição do utensílio usado para retirada do biofilme de *P. fluorescens* e dos oocistos de *C. parvum* capturados e, ou retidos na tubulação de PVC. (a) Haste de aço inoxidável com disco de neopreno em uma das extremidades e (b) orifícios do disco de neopreno (setas) para passagem da solução de eluição.

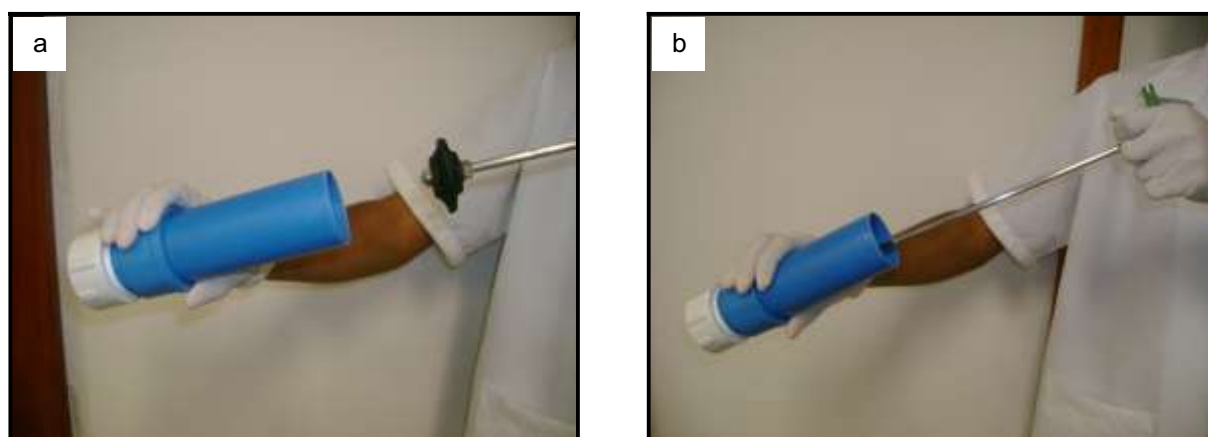


Figura 4 - Demonstração da etapa de retirada do biofilme de *P. fluorescens* e dos oocistos de *C. parvum* capturados e, ou retidos na tubulação de PVC. (a) Entrada da haste na tubulação e (b) Haste empurrada até o fundo da tubulação por seis vezes em movimentos de cima para baixo.

A partir de 1 mL da solução de eluição, foram realizadas diluições apropriadas, o plaqueamento foi realizado em ágar Cetrimide (Himedia[®]) e a incubação a 26 °C por 48 h. Após essas condições de crescimento, as unidades formadoras de colônias de *P. fluorescens* foram quantificadas e os resultados expressos em UFC·cm⁻² de acordo com a Equação 1 a seguir:

$$U = \frac{C \times D \times V}{A} \quad (1)$$

Em que:

U = nº de UFC de *P. fluorescens* por cm²;

C = Contagem de UFC de *P. fluorescens* no biofilme;

D = Inverso da diluição utilizada para plaqueamento;

V = Volume de solução de eluição usado para retirada do biofilme;

A = Área do reator (294 cm²).

O restante da solução de eluição foi utilizada para quantificar os oocistos capturados e retidos nos reatores pelo biofilme. Esse procedimento foi realizado segundo Cook et al. (2006) com modificações. Inicialmente, a solução de eluição juntamente com os oocistos foi distribuída em tubos de centrifuga com capacidade de 50 mL. As amostras foram centrifugadas a 2500 x g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. À medida que se realizou a centrifugação da solução de eluição com os protozoários, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e realizou-se a lavagem com mais solução de eluição nos mesmos de modo a juntar todos os sedimentos em um único tubo de centrifuga graduado ao final dessa etapa. O sedimento foi guardado a 6 °C ± 1 °C até o momento de visualização e enumeração de oocistos.

A quantificação do número de oocistos capturados e retidos foi realizada pela técnica de imunofluorescência direta utilizando-se o Kit diagnóstico Merifluor[®] C/G (Meridian Bioscience, Inc). A técnica de imunofluorescência foi realizada segundo a descrição a seguir (i) inicialmente todos os reagentes do Kit Merifluor[®] C/G, usados na identificação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, foram retirados da geladeira e mantidos à temperatura ambiente; adicionaram-se alíquotas de 10 µL retiradas dos sedimentos contidos nos tubos de centrifuga armazenados, em cada um dos poços das lâminas devidamente identificados; foram adicionados 10 µL dos

controles positivo e negativo nos respectivos poços das lâminas; o material inoculado foi espalhado em cada poço das lâminas com alças de inoculações descartáveis e as lâminas secaram às temperaturas entre 20 °C e 25 °C. Somente após a completa secagem das lâminas, estas foram submetidas à técnica de imunofluorescência. Para realização da imunofluorescência adicionou-se uma gota do reagente marcado, anticorpos monoclonais gênero específico conjugados a fluoresceína-isotiocianato (FITCmAb) e uma gota do reagente contracorante (solução de negro do eriocromo) em cada um dos respectivos poços das lâminas. As lâminas foram então colocadas em câmara úmida e deixadas durante 30 minutos, à temperatura de 20 °C a 25 °C. Realizou-se a rinsagem com a solução do *kit* devidamente diluída em solução de PBS (1:20); o excesso da solução de rinsagem foi removido cuidadosamente com auxílio de papel de filtro. Adicionou-se uma gota do meio de montagem com glicerol proveniente do *kit* em cada poço das lâminas e acrescentou-se a lamínula para realizar a observação em microscopia de imunofluorescência. As lâminas já montadas foram mantidas em câmara úmida a 6 °C ± 1 °C até o momento da leitura. Após a contagem de cada amostra e utilizando-se a média aritmética das duas análises (dois poços para cada amostra), o total de oocistos, expressos em número de oocistos.cm⁻² foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3 a seguir:

$$B = \frac{O \times S}{P \times V} \quad (2)$$

$$C = \frac{B}{A} \quad (3)$$

Em que:

B = nº oocistos·mL⁻¹;

O = média de oocistos contados nos dois poços;

S = volume de sedimento, em mL, gerado após centrifugação;

P = volume de amostra, em mL, adicionada em cada poço;

V = volume da solução de eluição, em L, usada para retirada de oocistos;

C = nº oocistos·cm⁻²;

A = Área do reator (294 cm²).

3.6. Caracterização topográfica da superfície da tubulação de poli (cloreto de vinila)

As microtopografias da superfície das tubulações de PVC utilizadas para irrigação de hortaliças folhosas foram avaliadas por Microscopia de Força Atômica usando o equipamento Universal SPM System Ntegra Prima/NT-MDT do Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV. A tubulação foi cortada em cupons com dimensões de 2 cm x 2 cm para posterior varredura da amostra.

As medidas foram realizadas utilizando o modo denominado de semicontato, no qual a ponta fica em contato intermitente com a superfície, utilizada para contornar as limitações do modo contato, devido ao risco de deformação da amostra (FERREIRA e YAMANAKA, 2006). A rugosidade da amostra foi avaliada pelos valores de Ra, Rq e Ry. Ra é a rugosidade média, medida como a média das diferenças de altura observadas, Rq é a rugosidade quadrática média e Ry é a diferença de altura entre o pico mais elevado e o vale mais profundo da superfície.

3.7. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi também utilizada para obtenção de informações sobre a distribuição e morfologia das células de *P. fluorescens* no biofilme e dos oocistos de *C. parvum* capturados e retidos pelo biofilme. Além disso, nesse tipo de microscopia também foi possível observar a microtopografia da superfície da tubulação de PVC.

3.7.1. Preparo das amostras

A tubulação de PVC foi cortada em cupons com dimensões de 2 cm x 2 cm e os mesmos foram colocados dentro dos reatores antes da contaminação inicial. Após o procedimento de formação de biofilmes de *P. fluorescens* por cinco dias consecutivos, inoculação de oocistos de *C. parvum* por um dia, realizou-se a rinsagem da tubulação com 400 mL de água destilada esterilizada para retirada de células planctônicas. Em seguida, os cupons foram retirados dos reatores e receberam os tratamentos prévios para posterior visualização por microscopia eletrônica de varredura. Nesse estudo

também foram analisados cupons sem microrganismos em biofilme para observação da microtopografia da superfície.

3.7.2. Desidratação das amostras e metalização com ouro

Para a fixação das células, os cupons de cada amostra da tubulação de PVC foram transferidos para solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) com pH $6,9 \pm 0,2$ e deixados por 1 h à temperatura entre 20°C e 25 °C. Em seguida, foi realizada uma rinsagem por 1 min com tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M. As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de álcool etílico P.A, nas concentrações de 30%; 50%; 70%; 80% e 95% durante 10 min em cada concentração. Logo após, foram realizadas três imersões consecutivas em álcool etílico P.A 100% por 15 min. As amostras desseccadas no etanol 100% foram transferidas para cestos do equipamento secador de ponto crítico (*Critical Point Dryer*) Balzers CPD 020, para evaporação do álcool utilizado na desidratação. Nessa etapa, todo o álcool da amostra foi substituído por gás carbônico na forma líquida, que ao atingir o ponto crítico é capaz de evaporar, tornando os cupons secos.

As amostras secas foram fixadas com fita dupla face no suporte de porta amostra do microscópio, conhecido como *stub* e, em seguida, levadas ao Metalizador Balzers Union FDU 010, onde foram submetidas ao processo de metalização com uma fina camada de ouro de 15 a 20 nm com a finalidade de tornar as amostras como boas condutoras elétricas (SILVEIRA, 1989). Posteriormente, os cupons foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 1430 VP, com aumentos variando de 1.000 x a 13.000 x.

3.8. Hidrofobicidade qualitativa, energia livre de superfície e energia livre de adesão

A metodologia usada para a determinação qualitativa da hidrofobicidade e energia livre foi realizada pela técnica experimental de medição de ângulos de contato. Foram utilizados cupons cortados da tubulação de PVC com dimensões de 2 cm x 2 cm para avaliar a influência da hidrofobicidade na adesão de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum*.

3.8.1. Preparo das células de *P. fluorescens* e dos oocistos de *C. parvum* para a medição de ângulos de contato

O preparo das células bacterianas e oocistos para medição do ângulo de contato foi realizado de acordo com metodologia descrita por Van der Mei et al. (1998). Foram avaliadas as culturas puras de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum*, bem como a cultura mista com ambos microrganismos.

A cultura pura de *P. fluorescens* foi ativada por três vezes consecutivas em caldo BHI (OXOID[®]) e incubada a 26 °C por 24 h. No caso da cultura pura de *C. parvum*, não houve necessidade de ativações. Foram realizadas centrifugações das células bacterianas e, ou dos oocistos a 1:900 x g por 15 min e os *pellets* foram lavados três vezes com PBS 0,1 M. As suspensões de microrganismos foram preparadas por ressuspensão dos *pellets* em PBS 0,1 M. Posteriormente, foram feitas filtrações das suspensões em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, com auxílio de bomba de vácuo (Milipore[®]). Para padronizar o conteúdo de umidade, as membranas com a camada de células e, ou de oocistos foram transferidas para placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) (Himedia[®]) e 10% de glicerol (v/v) (Isofar[®]), previamente preparadas, onde foram deixadas a 6 °C ± 1 °C por 30 min. Em seguida, as membranas foram fixadas com fita adesiva dupla face em lâmina de vidro para facilitar a leitura dos ângulos de contato.

3.8.2. Preparo das superfícies de tubulação de poli (cloreto de vinila) para a medição de ângulos de contato

Cupons da tubulação de PVC com dimensões de 2 cm x 2 cm foram colocados dentro dos reatores. Os cupons receberam os seguintes tipos de tratamentos para realização da medição dos ângulos de contato: (i) controle, ou seja, sem formação de biofilme de *P. fluorescens* e sem oocistos de *C. parvum*; (ii) com formação de biofilme de *P. fluorescens*; (iii) com formação de biofilme de *P. fluorescens* e oocistos de *C. parvum* e (iv) com oocistos de *C. parvum*.

Após o procedimento de formação de biofilmes de *P. fluorescens* por cinco dias consecutivos, inoculação de oocistos de *C. parvum* por um dia, realizou-se a rinsagem da tubulação com 400 mL de água destilada esterilizada para retirada de células planctônicas. Em seguida, os cupons foram retirados dos reatores e receberam os

tratamentos prévios para posterior medição dos ângulos de contato. Antes de serem submetidos à determinação dos ângulos de contato, os cupons foram fixados em lâminas de vidro com fita dupla face.

3.8.3. Ângulos de contato e avaliação qualitativa da hidrofobicidade das superfícies

Todas as medições dos ângulos de contato foram efetuadas à temperatura de 20 °C a 25 °C, utilizando-se três líquidos de diferentes polaridades: água, formamida (Vetec[®]) e alfa-bromonaftaleno (Vetec[®]). Os ângulos de contato foram determinados pelo método da gota séssil (Busscher et al., 1984), usando goniômetro de marca Kruss-GmH, (Hamburg, Germany). As amostras a serem analisadas foram colocadas sobre um suporte do aparelho e uma gota de volume constante de 2,5 µL dos líquidos utilizados foi aplicada sobre a superfície (Figura 5).

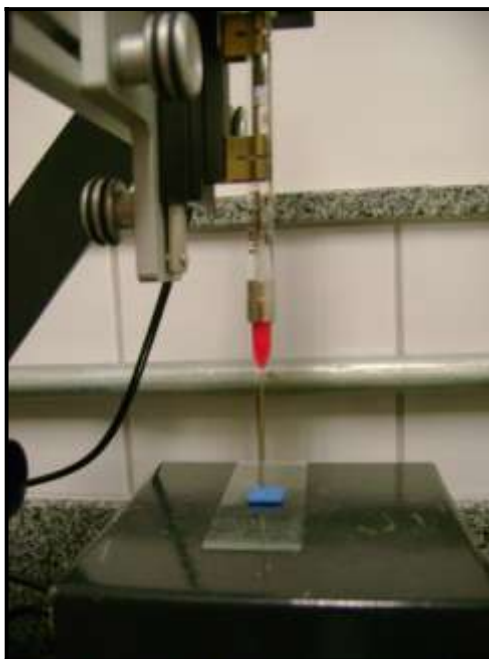


Figura 5 - Cupom de PVC, com dimensões de 2 cm x 2 cm, sobre o suporte do aparelho e aplicação da gota de um dos líquidos utilizados para medição do ângulo de contato.

A determinação do ângulo formado sobre a superfície foi efetuada imediatamente após a colocação da gota, por meio do sistema de análise de imagem do aparelho, que permite captar as imagens por meio de uma câmera de vídeo e

digitalizá-las em um computador pessoal onde está instalado um sistema automático de leitura (Figura 6).

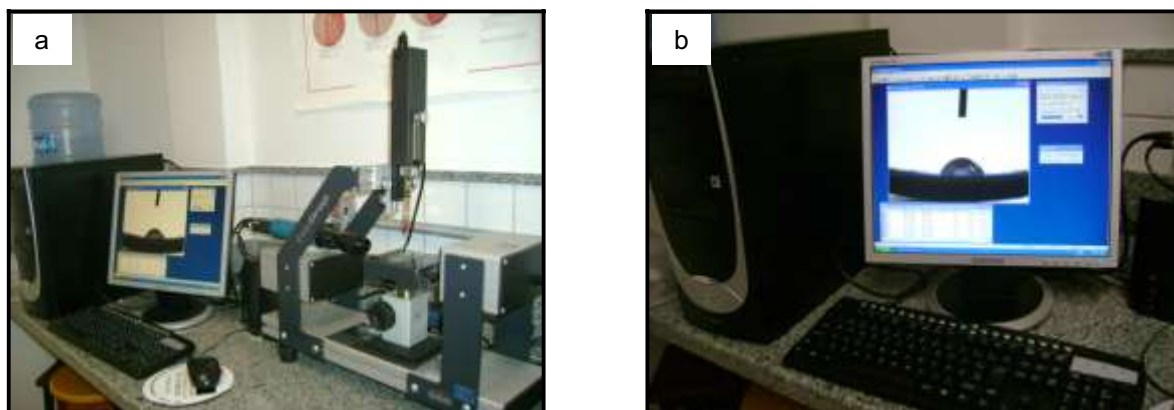


Figura 6 - Medição dos ângulos de contato na superfície de PVC: (a) Goniômetro e (b) Sistema de análise de imagem do aparelho.

O ângulo de contato das amostras com cada um dos líquidos foi medido trinta vezes, sendo realizadas três repetições para cada superfície avaliada. A avaliação qualitativa da hidrofobicidade das superfícies foi determinada de acordo com Van Oss e Giese (1995), que sugerem para valores de ângulos de contato com a água inferiores a 50° a superfície é considerada hidrofílica, enquanto que para ângulos de contato superiores a 50° a superfície é considerada hidrofóbica.

3.8.4. Determinação da energia livre de superfície

A hidrofobicidade é definida em termos da energia livre de interação entre as moléculas de uma superfície imersa em água, $\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}}$ (Van Oss e Giese, 1995). A energia livre de superfície foi determinada por meio das componentes da tensão superficial, segundo metodologia descrita por Van Oss e Giese (1995).

As três componentes da tensão superficial de cada superfície foram determinadas a partir dos ângulos de contato formados entre as superfícies e os três líquidos de polaridades diferentes. As componentes polares e apolares dos líquidos utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores das componentes da tensão superficial dos líquidos a 20 °C

Líquido	Tensão superficial (mJ·m ⁻²)			
	γ_1^{TOT}	γ_1^{LW}	γ_1^+	γ_1^-
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
α -bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6

Em que:

γ_1^{TOT} é a tensão superficial total do líquido; γ_1^{LW} é a tensão superficial relacionada as forças de interação ácido-base de Lewis; γ_1^+ é a tensão superficial relacionada ao componente acceptor de elétrons do componente ácido-base; γ_1^- é a tensão superficial relacionada ao componente doador de elétrons do componente ácido-base.

Os valores dos ângulos de contato obtidos com formamida (θ_F), água (θ_W) e α -bromonaftaleno (θ_B) e das componentes de tensão superficial dos líquidos da Tabela 1 foram aplicados na equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes (Equação 4) para obtenção das três componentes da tensão superficial das superfícies avaliadas γ_S^{LW} ; γ_S^+ ; γ_S^- , dada por:

$$(1 + \cos\theta) \times \gamma_1^{TOT} = 2 \times \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \times \gamma_1^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_S^- \times \gamma_1^+} \right) \quad (4)$$

Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula e portanto, a equação anterior é expressa por (Equação 5):

$$\gamma_S^{LW} = \frac{\gamma_1^{TOT}}{4} \times (1 + \cos\theta)^2 \quad (5)$$

A partir dos valores das três componentes da tensão superficial é possível calcular a tensão superficial global de uma superfície (γ_S^{TOT}) através da Equação 6:

$$\gamma_S^{TOT} = \gamma_S^{LW} + \gamma_S^{AB} \quad (6)$$

Em que (Equação 7):

$$\gamma_S^{AB} = 2 \times \sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_S^-} \quad (7)$$

Segundo Van der Mei et al. (1998), nos casos em que a partir da resolução das equações obtiver valores negativos de γ_S^+ ou γ_S^- , o quadrado dos mesmos é nulo. A energia livre global de interação (ΔG_{sws}^{TOT}) entre as moléculas da superfície imersa em água é dada pela soma entre os componentes apolar (ΔG_{sws}^{LW}) e polar da energia livre de interação (ΔG_{sws}^{AB}) (Equação 8):

$$\Delta G_{sws}^{TOT} = \Delta G_{sws}^{LW} + \Delta G_{sws}^{AB} \quad (8)$$

Em que (Equações 9 e 10):

$$\Delta G_{sws}^{LW} = -2 \times \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}} \right)^2 \quad (9)$$

$$\Delta G_{sws}^{AB} = -4 \times \left[\left(\sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_S^-} + \sqrt{\gamma_W^+ \times \gamma_W^-} - \sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_W^-} - \sqrt{\gamma_W^+ \times \gamma_S^-} \right) \right] \quad (10)$$

Pela resolução das equações acima, a partir dos valores das componentes de tensão superficial, obtêm-se o valor de ΔG_{sws}^{TOT} que nos permite tirar conclusões quanto ao caráter hidrofóbico ou hidrofílico da superfície. Quando $\Delta G_{sws}^{TOT} < 0$ a superfície é considerada hidrofóbica, caso contrário, hidrofílica.

3.8.5. Determinação da energia livre total de adesão

O estudo da interação entre duas superfícies imersas em água, permite quantificar a energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}^{TOT}$), que pode ser expressa pela Equação 11:

$$\Delta G_{ades\tilde{a}o}^{TOT} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_{1W}^{LW} - \gamma_{2W}^{LW} + 2 \times [\sqrt{\gamma_w^+} (\sqrt{\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_w^-}) + \sqrt{\gamma_w^-} (\sqrt{\gamma_1^+} + \sqrt{\gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_w^+}) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}] \quad (11)$$

Em que (Equação 12):

$$\gamma_{12}^{LW} = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2 \times \sqrt{\gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW}} \quad (12)$$

Nas Equações 11 e 12 descritas acima, 1 corresponde a superfície de adesão, 2 representa a bactéria e w refere-se a gua.

Pela aplicao das equaes 9 e 10 obtem-se o valor da energia livre total de adesão que permite fazer uma avaliao termodinâmica do fenmeno de adesão. Segundo a teoria termodinâmica a adesão será favorável se a interao conduzir a uma diminuio da energia livre global. Se ($\Delta G_{ades\tilde{a}o}^{TOT} < 0$) a adesão  favorecida, caso contrário,  termodinamicamente desfavorável.

3.9. Controle de biofilmes de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum* aderidos em tubulao de PVC pelo surfactante cloreto de benzalcônio

3.9.1. Formao de biofilmes de *P. fluorescens*

A formao de biofilmes foi realizada utilizando a estirpe de referência *P. fluorescens* ATCC 13525, que foi preparada conforme descrito no item 3.1. Os procedimentos de higienizao de tubulao de PVC, tampas rosqueáveis e mangueiras foram realizados conforme descrito no item 3.2. A montagem de cada sistema para formao de biofilmes seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 3.3.

3.9.2. Inoculação de *C. parvum*

Foram inoculados oocistos de *C. parvum* com o intuito de promover a adesão do protozoário ao biofilme de *P. fluorescens*, para que, posteriormente, ambos fossem submetidos à aplicação do surfactante.

Após cinco dias de formação de biofilme de *P. fluorescens*, oocistos de *C. parvum* foram inoculados em 600 mL de MMS de modo a obter concentrações de 10^4 oocistos·mL⁻¹, no sistema experimental (Figura 2). Da mesma forma realizada com a suspensão bacteriana, 400 mL de suspensão de oocistos foram adicionados a cada reator e 200 mL foram adicionados a cada frasco de vidro, utilizado para circulação. A suspensão do protozoário foi circulada por 12 h a 20 mL·min⁻¹ e mantida em repouso por 12 h.

3.9.3. Aplicação do surfactante

O surfactante testado foi o Cloreto de Benzalcônio (CB) obtido da Sigma Química[®]. Este surfactante pertence ao grupo dos compostos quaternários de amônio (ANDRADE, 2008).

O surfactante CB foi adquirido no estado líquido viscoso com concentração de 50% de pureza. Inicialmente foi preparado 1 L de solução estoque a 2800 mg·L⁻¹ em água destilada esterilizada, à temperatura ambiente. A partir dessa solução, foram preparadas, por diluição em água destilada esterilizada, as demais concentrações de trabalho. A cada vez que se realizava um ensaio, uma nova solução estoque foi preparada de forma a garantir que a mesma se mantinha com características constantes.

Nos testes laboratoriais realizados, as concentrações de CB usadas para avaliar o efeito de remoção e, ou inativação de *P. fluorescens* em biofilme juntamente com oocistos de *C. parvum* aderidos ao biofilme e à tubulação de PVC foram: 400 mg·L⁻¹, 800 mg·L⁻¹, 1200 mg·L⁻¹, 1600 mg·L⁻¹ e 1800 mg·L⁻¹; 2000 mg·L⁻¹; 2200 mg·L⁻¹; 2400 mg·L⁻¹; 2600 mg·L⁻¹ e 2800 mg·L⁻¹. O critério de seleção dessas dez concentrações de CB foi testar o efeito antimicrobiano abaixo e acima da concentração micelar crítica (CMC = 1876 mg·L⁻¹) deste surfactante (SMITH et al., 2002).

Depois do biofilme formado e dos oocistos aderidos ao sistema, o MMS utilizado no último dia de circulação foi retirado do reator e descartado. Em seguida, foram

colocadas as tampas sem furo (Figura 7), previamente esterilizadas conforme descrito em 3.2 e adicionados 100 mL de solução surfactante na concentração desejada no reator.



Figura 7 - Reator de PVC fechado com as tampas sem furo.

Os reatores foram submetidos a movimentos rotatórios, colocando-os em uma superfície plana a partir de um ponto central e movimentando-os três vezes, no sentido longitudinal para cima, três vezes longitudinalmente para baixo, três vezes no sentido lateral para a direita, três vezes lateralmente para a esquerda e, por fim, três movimentos tipo baliza, realizados manualmente. Esse procedimento de movimentos rotatórios foi realizado por seis vezes seguidas, sobre um molde quadrado (46 cm x 46 cm), delimitado na bancada do laboratório (Figura 8). Esse procedimento de higienização foi realizado segundo a metodologia descrita por Gilmour et al. (1993).

Em sequência, a solução de CB foi retirada do reator, realizou-se neutralização com 400 mL de solução de Tween 80 a 2% por 1 min e rinsagem com 400 mL de água destilada esterilizada. Nessa etapa de rinsagem, o reator foi submetido a movimentos lentos tipo baliza por seis vezes, sendo a água destilada descartada após esse procedimento.

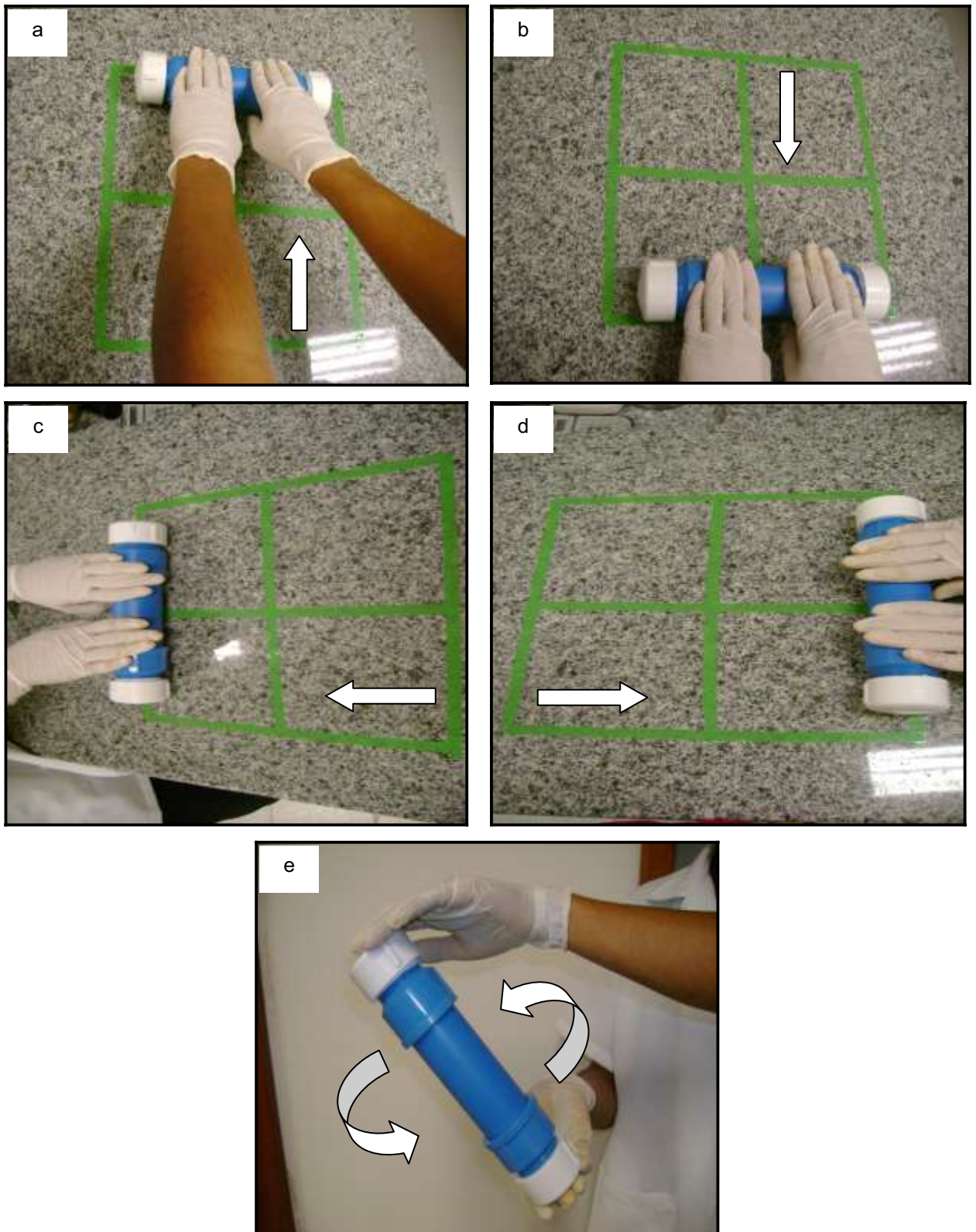


Figura 8 - Movimentos rotatórios nos sentidos: (a) longitudinal para cima, (b) longitudinal para baixo, (c) lateral para a esquerda, (d) lateral para a direita e (e) tipo baliza.

3.9.4. Recuperação de células de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum* após aplicação do surfactante

Após a retirada da água de rinsagem, as tubulações foram preenchidas com 100 mL de solução de eluição, composta por 100 mL de solução de Tween 80 a 1 %, 0,1 mL de emulsão anti-espumante (Anti-Foam A, Sigma Aldrich®) e 1000 mL de água destilada (q. s. p). Em seguida, realizaram-se os mesmos procedimentos de raspagem dos microrganismos na tubulação e de quantificação dos mesmos conforme descrito no item 3.5.

Foram calculados os números de reduções decimais (RD) para cada tratamento de aplicação do surfactante. Dessa forma, utilizou-se a Equação (13) para realizar o cálculo do número de RD.

$$RD = X_0 - X_1 \quad (13)$$

Em que:

RD = número de reduções decimais;

X_0 = \log_{10} do número de oocistos de *C. parvum* por cm^2 ou \log_{10} do número de células de *P. fluorescens* por cm^2 , ambos aderidos à superfície da tubulação de PVC;

X_1 = \log_{10} do número de oocistos de *C. parvum* por cm^2 ou \log_{10} do número de células de *P. fluorescens* por cm^2 , ambos após a aplicação da solução de surfactante.

3.9.5. Visualização dos microrganismos

Os biofilmes de *P. fluorescens* e os oocistos de *C. parvum* presentes na superfície das tubulações de PVC foram avaliados por Microscopia de Força Atômica (MFA) antes e após a aplicação das soluções surfactantes. A MFA foi realizada com o auxílio do equipamento Universal SPM System Ntegra Prima/NT-MDT do Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV. A tubulação foi cortada em cupons com dimensões de 2 cm x 2 cm para posterior varredura da amostra.

3.10. Análise dos resultados

O experimento de captura e retenção de *C. parvum* foi conduzido em seis repetições com o objetivo de se comparar as médias dos oocistos capturados e retidos pelo biofilme pelo teste t. As médias com e sem a formação do biofilme foram comparadas pelo teste t para dados pareados.

Para avaliação das concentrações de *P. fluorescens* em suspensão no meio de circulação no início e ao final de cada dia de circulação nos reatores foi realizado um experimento fatorial 2 x 6 com três repetições no Delineamento Inteiramente Casualizado. O fator reator foi constituído de uma variável binária com os valores de 1 e 2, representando a captura e a retenção dos oocistos de *C. parvum*, respectivamente. Foram realizadas combinações entre o reator 1 ou 2 com os seis dias de avaliação da concentração bacteriana em suspensão no Meio Mínimo de Sais.

Os resultados dos parâmetros de rugosidade e de hidrofobicidade por medição dos ângulos de contato foram analisados por meio de estatística descritiva das médias com seus respectivos desvios-padrão.

Para o controle dos microrganismos aderidos na tubulação de PVC, foram realizadas análises de regressão para verificar o efeito da concentração do cloreto de benzalcônio sobre a remoção de *P. fluorescens* e *C. parvum*. Os coeficientes de regressão foram testados pelo teste t.

Todas as análises estatísticas foram realizadas a 5% de probabilidade e todos os resultados foram analisados pelo Sistema de Análises Estatísticas – SAEG versão 9.0 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Formação de biofilmes de *P. fluorescens* na tubulação de PVC utilizada na irrigação de hortaliças

Os biofilmes de *P. fluorescens* formados em tubulação de PVC, atingiram concentrações médias semelhantes em torno de 1×10^7 UFC·cm⁻² ($P > 0,05$) nos reatores de captura e retenção de oocistos após 6 dias de formação (Figura 9). Assim, constatou-se que seis vezes de aumento do fluxo na tubulação por uma hora não influenciou na liberação de células do biofilme nos reatores de retenção. A Figura 10 ilustra fotomicrografias de biofilmes formados nas tubulações avaliadas. Foi possível visualizar, por microscopia eletrônica de varredura, a presença de exopolissacarídeos entre as células de *P. fluorescens* (Figura 10a), o que reforça a capacidade de fixação bacteriana na superfície da tubulação.

O líquido circulante nos reatores, composto por Meio Mínimo de Sais (MMS) inoculado com células de *P. fluorescens*, cuja concentração inicial foi em torno de 10^6 UFC.mL⁻¹ em todos os seis dias de avaliação, apresentou um aumento de até dois ciclos logarítmicos ao final de cada dia de formação do biofilme (Figura 11). Constatou-se nos primeiros e segundos dias de formação do biofilme, concentrações finais médias em torno de $6,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ no MMS. A partir do terceiro dia, as suspensões utilizadas para circulação atingiram valores maiores que $1,2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. As suspensões bacterianas em MMS apresentaram concentrações finais pouco variadas (Figura 11). Dessa forma, não foi constatada diferença ($P > 0,05$) entre as concentrações finais do MMS ao final de cada dia de formação de biofilme.

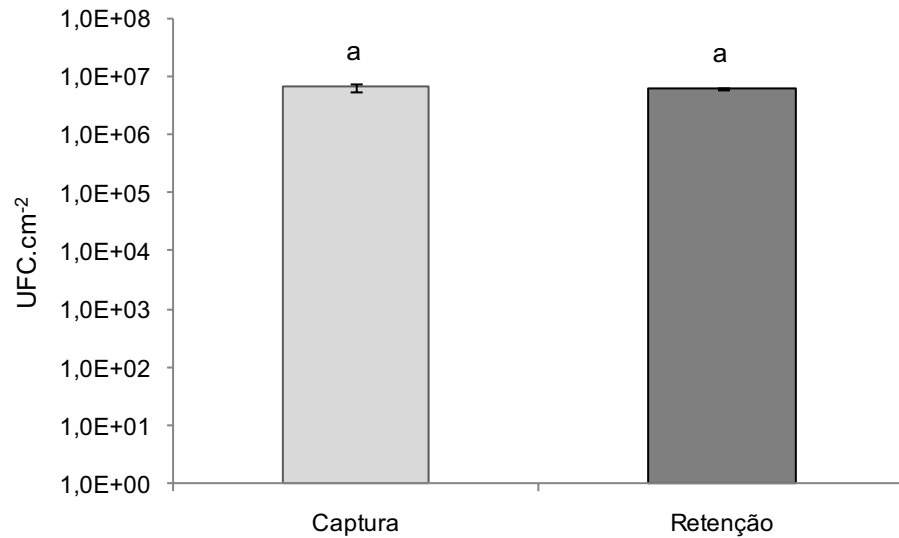


Figura 9 - Concentrações médias de *P. fluorescens* em biofilme formado por seis dias a 25 °C, em tubulação de poli (cloreto de vinila) utilizada para irrigação de hortaliças. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t ($P > 0,05$).

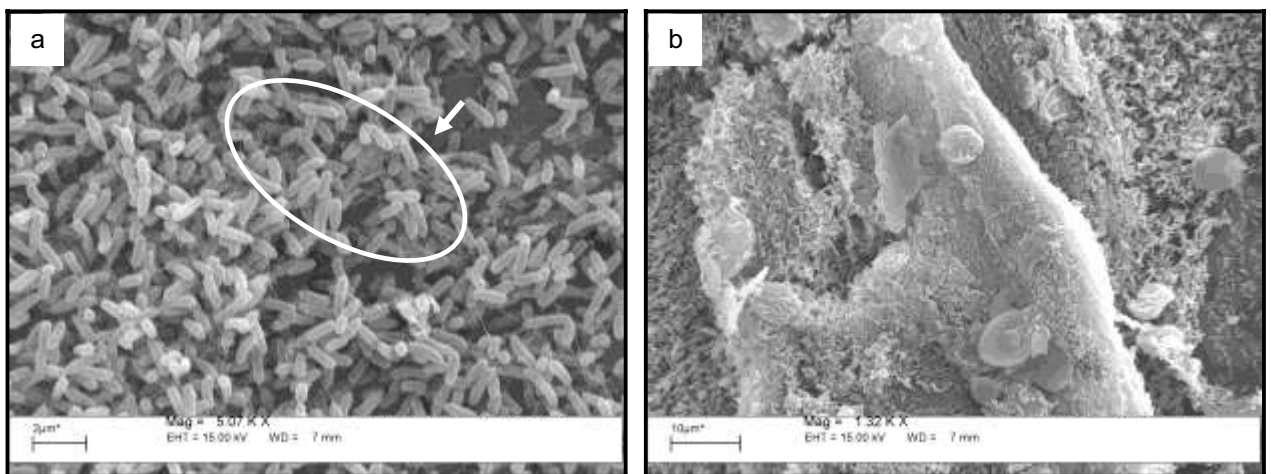


Figura 10 - Biofilmes de *P. fluorescens* em superfícies de tubulações de poli (cloreto de vinila) utilizadas para irrigação de hortaliças, observadas por microscopia eletrônica de varredura: (a) presença de exopolissacarídeos (seta) e (b) biofilme maduro.

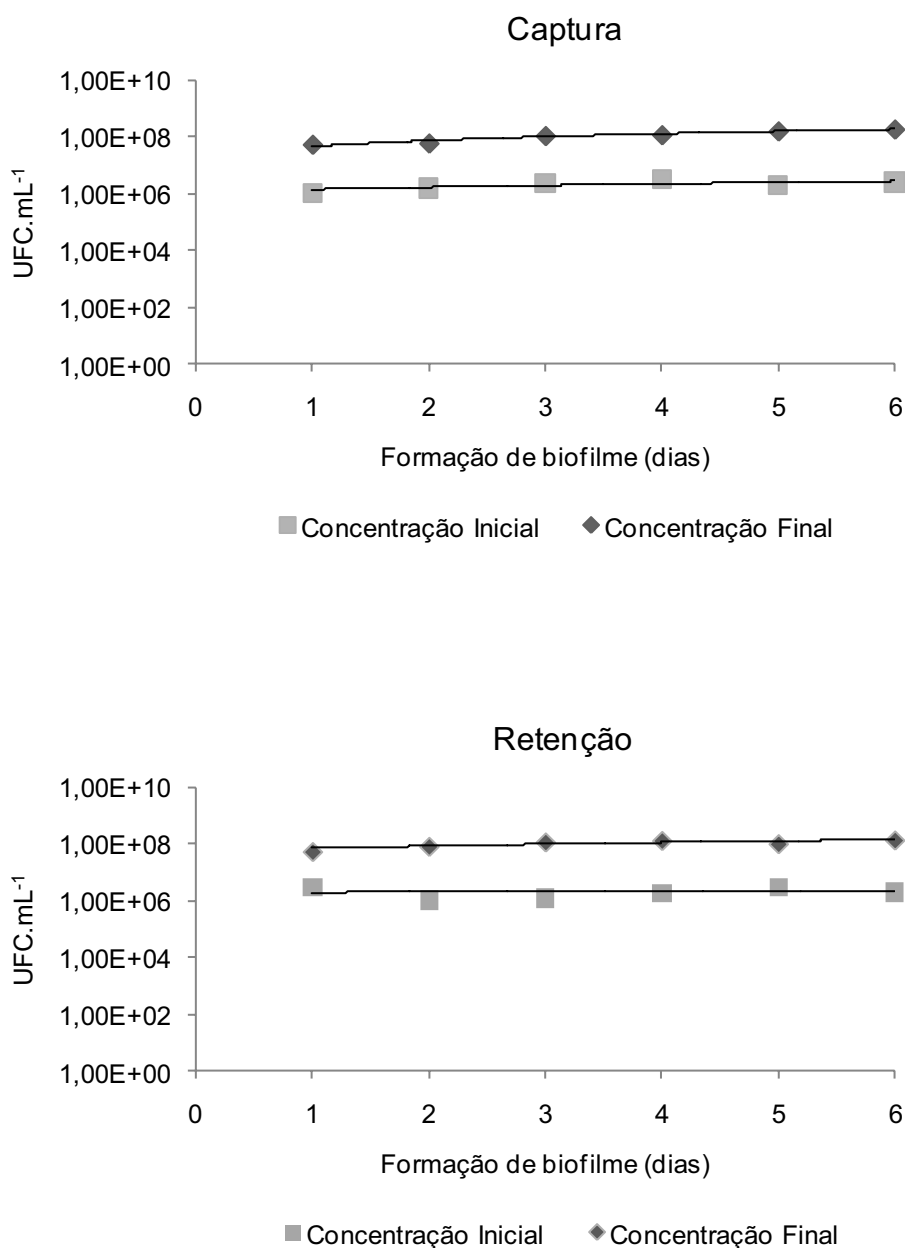


Figura 11 - Concentrações médias de *P. fluorescens* em suspensão no meio mínimo de sais, inoculadas a 25 °C, no início e ao final de cada dia de formação do biofilme na tubulação de poli (cloreto de vinila).

Kerr et al. (1999) avaliaram biofilmes bacterianos em diferentes tipos de materiais em contato com água potável e comprovaram que, durante a fase de formação de biofilme, existe sempre uma correlação positiva elevada entre o número de bactérias do biofilme e o número de bactérias no meio líquido, independente do tipo de material que suporta o biofilme, da temperatura e da concentração de cloro residual da água. Estes resultados indicaram que as bactérias do biofilme são continuamente desprendidas deste para o meio líquido, resultando em deterioração da qualidade

microbiológica da água como consequência da formação de biofilme nas tubulações dos sistemas de distribuição de água potável.

O desprendimento de células bacterianas do biofilme pode ser comprovado nesse estudo, pois no sexto dia do experimento havia inoculação apenas de oocistos de *C. parvum* no MMS. No entanto, quando se determinaram as concentrações de *P. fluorescens* após 24 h de contato com os reatores de PVC, foram constatadas contagens atingindo entre 10^7 a 10^8 UFC·mL⁻¹ (Figura 11). Entretanto, Boe-Hansen et al. (2002) referiram que o número de bactérias na fase planctônica não se deve apenas às bactérias que são libertadas do biofilme, mas também ao crescimento das bactérias no meio líquido, que também deve ser considerado.

4.2. Captura e retenção de oocistos de *C. parvum* por biofilmes de *P. fluorescens* e adesão de oocistos de *C. parvum* em tubulação de PVC

Houve diferença entre o número de oocistos de *C. parvum* capturados e retidos pelo biofilme de *P. fluorescens* na tubulação de PVC ($P < 0,05$), sendo que o número de oocistos quantificados nos reatores de captura foi sempre maior do que nos reatores de retenção. Dessa forma, constatou-se que as células de *P. fluorescens* fortemente aderidas na tubulação foram capazes de capturar, em média, cerca de $1,1 \times 10^3$ oocistos·cm⁻² e reter $5,6 \times 10^1$ oocistos·cm⁻² (Figura 12).

Quando os oocistos de *C. parvum* circulavam sozinhos na tubulação, sem a presença do biofilme, observou-se valores médios de oocistos·cm⁻² cerca de 1000 vezes menores nos reatores de avaliação da captura e cerca de 120 vezes menores nos reatores de avaliação de retenção (Figura 12). Assim, foi observado que apenas 1,02 e 0,45 oocistos·cm⁻² foram capazes de se fixar nos reatores de captura e de retenção, respectivamente, quando havia somente os protozoários no meio de circulação dos reatores (Figura 12).

O número de oocistos aderidos sozinhos na tubulação, ou seja, sem o biofilme formado, diferiram com o aumento de cerca de seis vezes do fluxo do líquido circulante ($P < 0,05$). Dessa forma, o número de oocistos aderidos foi sempre menor após o aumento de fluxo. Esses resultados mostraram que a formação do biofilme pode ser determinante para o aprisionamento dos oocistos na tubulação. Uma justificativa para tal fato deve-se à produção de exopolissacarídeos, também conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares, pelas células de *P. fluorescens* quando estão

em biofilme, que são responsáveis pela maior fixação das bactérias e também dos protozoários pelo biofilme, no caso desse experimento. A influência dos exopolissacarídeos sobre a formação de biofilmes foi estudada em outras pesquisas (AZEREDO E OLIVEIRA, 2000; DOMOZYCH et al., 2005). Segundo Azeredo e Oliveira (2000), os exopolissacarídeos têm um papel importante na formação de biofilmes devido ao seu envolvimento na adesão bacteriana. Essas substâncias também determinam muitas propriedades do biofilme tais como força e elasticidade. Além disso, a matriz exopolimérica constitui um reservatório de nutrientes e tem um efeito protetor contra substâncias tóxicas como sanitizantes e antibióticos.

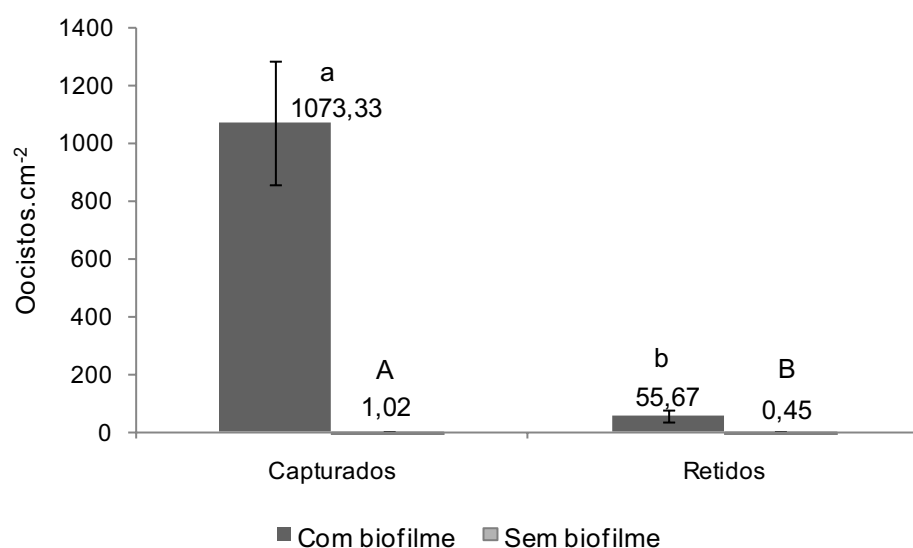


Figura 12 - Oocistos de *C. parvum* capturados ou retidos com e sem a formação de biofilme de *P. fluorescens* em tubulação de PVC utilizada na irrigação de hortaliças. Médias de oocistos.cm⁻² seguidas pela mesma letra minúscula nas barras “com biofilme” e pela mesma letra maiúscula nas barras “sem biofilme” não diferem entre si pelo teste t ($P > 0,05$).

Contudo, vários fatores estão associados à adesão bacteriana e formação de biofilmes podendo contribuir para a maior fixação das células às superfícies. Assim, além da produção de exopolissacarídeos, outros fatores podem influenciar a formação de biofilmes como: (i) as propriedades superficiais dos suportes de adesão e dos microrganismos envolvidos, como a carga superficial (GILBERT et al., 1991) e hidrofobicidade (JOSHUA et al., 2006), (ii) as características das células microbianas como a presença de apêndices celulares (WATNICK et al., 2001) e (iii) das propriedades do meio aquoso, como presença de substâncias que podem condicionar

as superfícies (VALCARCE et al., 2002), pH, temperatura, tipo de meio circulante e velocidade de escoamento (CHAVES, 2004).

Por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi possível visualizar que os oocistos capturados e os retidos não foram capazes de penetrar nas camadas mais profundas do biofilme, encontrando-se, então, aderidos em partes superficiais dessa comunidade bacteriana (Figura 13). As células de *P. fluorescens* em biofilme mostraram-se em concentrações elevadas de modo que foi possível visualizar algumas camadas existentes e a presença de exopolissacarídeos no biofilme (Figura 13a). A Figura 13 (b, c e d) ilustra uma possível interação existente nessa comunidade microbiana culminando com o aprisionamento dos oocistos pelas células bacterianas.

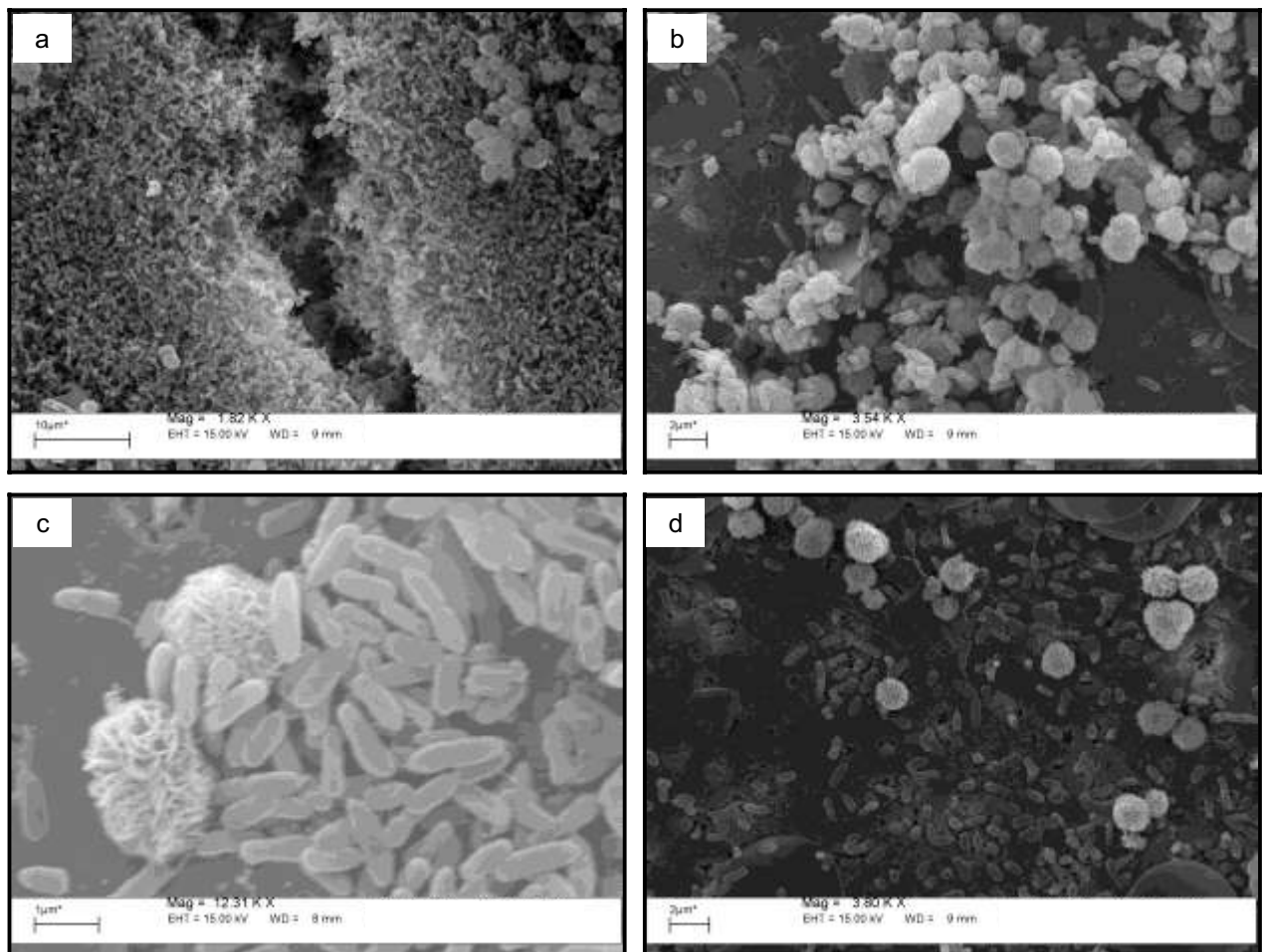


Figura 13 - Oocistos de *C. parvum*: (a) e (b) capturados ou (c) e (d) retidos por biofilmes de *P. fluorescens* em tubulação de PVC utilizada na irrigação de hortaliças, avaliados por microscopia eletrônica de varredura.

A capacidade de oocistos de *C. parvum* serem capturados e retidos por biofilmes de *P. fluorescens* podem contribuir para uma maior contaminação de hortaliças que

forem irrigadas com águas transportadas por tubulações com elevadas concentrações de bactérias aderidas. Essa contaminação pode ocorrer pelo fato dos oocistos serem facilmente desprendidos do biofilme e, conseqüentemente, transportados pelo fluxo de água durante a irrigação.

Os resultados demonstraram que, uma vez formado, o biofilme de *P. fluorescens* propiciou o aumento da deposição de oocistos de *C. parvum* na tubulação de PVC. Dessa forma, as interações entre biofilme bacteriano e oocistos possuem funções importantes na migração de *C. parvum* em sistemas de produção de hortaliças.

4.3. Avaliação topográfica da superfície de PVC por microscopia de força atômica

Foi possível observar, por microscopia de força atômica, que a microtopografia da superfície da tubulação de PVC utilizada para irrigação de hortaliças possui imperfeições tais como microporos, elevações e depressões. Essas imperfeições possuem dimensões suficientes para alojar microrganismos e, conseqüentemente, para provocar sua multiplicação quando condições favoráveis de nutrientes, pH, temperatura, entre outros fatores, estiverem disponíveis (Figura 14).

Os dados da rugosidade do PVC estão apresentados na Tabela 2. A tubulação de PVC possui uma superfície rugosa, apresentando valores de rugosidade média (R_a) de 479,72 nm. O valor de R_y , que representa a diferença de altura entre o pico mais alto e o vale mais profundo da superfície foi de 4.381,61 nm, valor que indica a rugosidade desse material (Tabela 2).

Um dos fatores que regem a aderência de uma célula microbiana em uma superfície sólida é a rugosidade da superfície (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004). Whitehead et al. (2004), afirmam que um aumento no valor de R_a da superfície provocará um aumento da retenção microbiana nesse local. A partir dos parâmetros de rugosidade encontrados pode-se observar que os valores encontrados de R_a , R_q e R_y seriam alguns dos fatores que influenciaram na capacidade de formação de biofilme de *P. fluorescens* na tubulação de PVC.

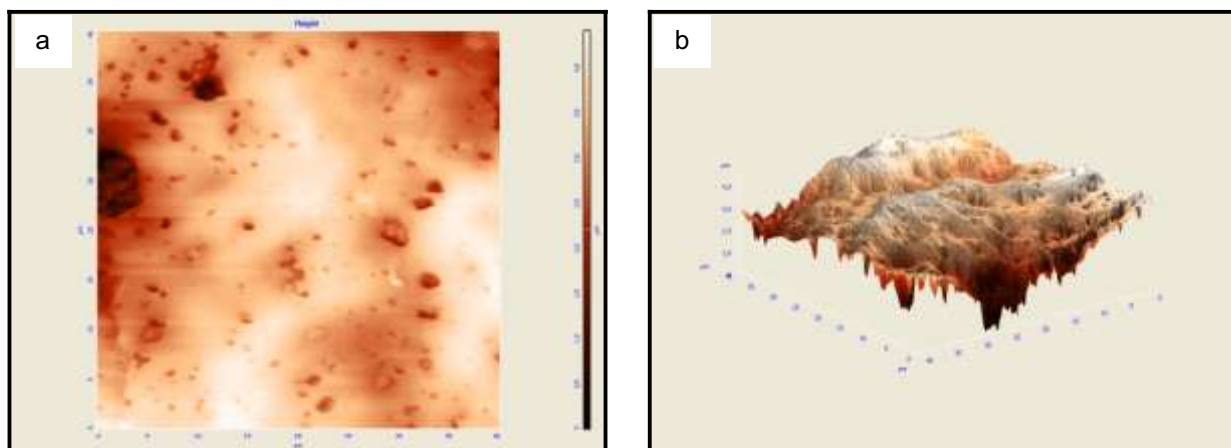


Figura 14 - Microtopografias da superfície da tubulação de poli (cloreto de vinila) utilizada na irrigação de hortaliças folhosas, em planos (a) bidimensional e (b) tridimensional, realizadas por microscopia de força atômica.

Tabela 2 - Parâmetros de rugosidade da superfície da tubulação de PVC utilizada para irrigação de hortaliças folhosas medidos por microscopia de força atômica

Parâmetros	Medidas (nm)	DP*	CV **(%)
Rugosidade Média (Ra)	479,72	31,69	6,60
Rugosidade Quadrática Média (Rq)	620,81	25,06	4,04
Diferença de altura (Ry)	4.381,61	13,70	0,31

* DP = Desvio Padrão; ** CV = Coeficiente de variação

Alguns trabalhos reportaram uma relação entre rugosidade da superfície e retenção microbiana. Verran et al. (2001) verificaram que o maior valor de Ra de polimetil metacrilato resultou em um maior número de células aderidas de *C. albicans*. Segundo Verran e Boyd (2001) o aumento da área da interface microrganismo/material proporciona mais pontos de contato, facilitando assim que a adesão irreversível se estabeleça.

4.4. Influência da hidrofobicidade na formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* e dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* aderidos em tubulação de PVC

O ângulo de contato com a água fornece uma informação qualitativa sobre a hidrofobicidade da superfície (OLIVEIRA et al., 2006). A amostra é considerada hidrofóbica se o ângulo for maior que 50° e hidrofílica quando inferior ou igual a 50°

(Oss e Giese, 1995). De acordo com esse critério, pode-se dizer que a superfície da tubulação de PVC é hidrofóbica, enquanto que superfícies das células de *P. fluorescens*, dos oocistos de *C. parvum* e da cultura mista de bactéria com o protozoário são hidrofílicas (Tabela 3). Entretanto, outros autores como Vogler (1998), consideram que quando os ângulos de contato formados pela água sobre uma superfície são inferiores a 65°, a superfície é hidrofílica, para valores superiores trata-se de uma superfície hidrofóbica.

A superfície da tubulação de PVC avaliada nesse experimento apresentou característica hidrofóbica com média de ângulos de 77,2° (Tabela 3) quando o líquido de avaliação foi a água. A hidrofobicidade de superfícies de PVC também foi avaliada em outros estudos, nos quais os ângulos de contato formados com a água foram 88,5° (KACZMAREK et al., 2002), 92,4° (CARELI et al., 2008), 103° (LI et al., 2006) e 117,9° (CHAVES, 2004). Embora os autores relatarem algumas variações nos valores dos ângulos de contato formados com a água da superfície de PVC, todos os resultados encontrados nesses estudos mostraram que o PVC é uma superfície hidrofóbica.

Células de *P. fluorescens* apresentaram valores médios de ângulo de contato com a água de 19,9° (Tabela 3), o que confirma sua propriedade hidrofílica. Outros trabalhos relataram ângulos de contato com a água de 17,4° (YEO e CHUA, 2004), 21,9° (CARELI et al., 2008), 25° (MACHADO, 2005) e 28° (CHAVES, 2004) concordando com o caráter de hidrofílicidade da bactéria avaliada.

Tabela 3 - Valores médios dos ângulos de contato (θ) determinados à temperatura ambiente sobre as superfícies da tubulação de PVC, de *P. fluorescens* ATCC 13525, de oocistos de *C. parvum* e dos dois microrganismos em cultura mista com água (θ_W), formamida (θ_F) e α -bromonaftaleno(θ_B)

Superfície	θ_W^*	θ_F^*	θ_B^*
Tubulação de PVC	77,2° ± 1,56	59,6° ± 1,72	33,9° ± 3,47
<i>P. fluorescens</i>	19,9° ± 4,34	22,4° ± 1,95	90,0° ± 0,86
<i>C. parvum</i>	39,5° ± 3,58	30,3° ± 2,27	65,0° ± 1,64
<i>P. fluorescens</i> e <i>C. parvum</i>	25,1° ± 3,62	23,1° ± 4,30	18,7° ± 0,88

* Média ± Desvio Padrão

A caracterização termodinâmica da superfície bacteriana é um reflexo das características físico-químicas da superfície, que são definidas por componentes

macromoleculares, como lipopolissacarídeos, proteínas e exopolímeros, que variam em quantidade de acordo com as condições de crescimento e de estirpe para estirpe (STREVETT e CHEN, 2003).

Concordando com o resultado qualitativo de hidrofobicidade obtido pela medição do ângulo de contato com a água (Tabela 3), os valores de energia livre de superfície indicaram que a superfície da tubulação de PVC é hidrofóbica ($\Delta G_{\text{sWS}} < 0$) (Tabela 4). Em se tratando dos microrganismos, pode-se dizer que estes, tanto em cultura pura quanto em cultura mista, possuem superfícies hidrofílicas ($\Delta G_{\text{sWS}} > 0$) (Tabela 4), o que reforça os valores dos ângulos de contato obtidos das superfícies com a água (Tabela 3).

Relativamente pouca informação encontra-se disponível sobre a hidrofobicidade de oocistos de *C. parvum*. Os oocistos avaliados nesse experimento apresentaram caráter hidrofílico, concordando com os dados encontrados em outras pesquisas (DRODZ e SCHWARTZBROD, 1996; DAI e HOZALSKI, 2003; KUZNAR e ELIMELECH, 2005 e 2006). Entretanto, Hsu e Huang (2002) reportaram que os oocistos avaliados possuíam um caráter mais hidrofóbico.

Tabela 4 - Valores das componentes de tensão superficial (γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^-) e grau de hidrofobicidade (ΔG_{sWS}) das superfícies da tubulação de PVC, de *P. fluorescens* ATCC 13525, de oocistos de *C. parvum* e dos dois microrganismos em cultura mista

Superfície	Tensão superficial ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)			ΔG_{sWS}^*
	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-	
Tubulação de PVC	37,17	0,03	9,00	- 44,08
<i>P. fluorescens</i>	11,10	15,02	49,41	6,72
<i>C. parvum</i>	22,47	3,88	63,87	36,25
<i>P. fluorescens</i> e <i>C. parvum</i>	42,09	0,53	49,24	27,41

* Valores expressos em $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$

É conhecido que, em solução aquosa, a adesão é favorecida entre superfícies hidrofóbicas, uma vez que a camada de água que reveste as duas superfícies é removida. Entretanto, pode ocorrer adesão entre uma superfície hidrofóbica e outra hidrofílica ou entre duas superfícies hidrofílicas (Van Oss, 1997).

4.5. Avaliação da Energia Livre de Adesão

De acordo com a teoria termodinâmica, a adesão é favorecida se a variação da energia livre por unidade de área da superfície for negativa, o que significa que a adesão espontânea é acompanhada por uma diminuição da energia livre do sistema, como previsto pela Segunda Lei da Termodinâmica. Nesse sentido, o estudo da previsão teórica da formação de biofilmes de *P. fluorescens* e da adesão de oocistos de *C. parvum* à superfície da tubulação de PVC, permitiu verificar que a adesão é termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão}^{TOT} < 0$) em todos os casos (Tabela 5).

Na Tabela 5 encontram-se os valores da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}^{TOT}$), que permitem fazer uma previsão teórica da formação de biofilmes de *P. fluorescens* e da adesão de *C. parvum* na tubulação de PVC. Os dados revelam que a adesão foi mais favorável quando o biofilme de *P. fluorescens* estava formado juntamente com os oocistos de *C. parvum* capturados pelo biofilme ($\Delta G_{adesão}^{TOT} = - 28,56 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$) e quando somente células de *P. fluorescens* em biofilme estavam presentes ($\Delta G_{adesão}^{TOT} = - 21,89 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$) do que quando somente oocistos do protozoário entraram em contato com a superfície de adesão ($\Delta G_{adesão}^{TOT} = - 14,29 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$). Dessa forma, quando foram avaliadas as interações existentes entre o biofilme de *P. fluorescens* e a superfície do PVC e entre o biofilme de *P. fluorescens*, os oocistos capturados e, ou retidos pelo biofilme e a superfície de PVC, observaram-se menores valores de energia livre de adesão.

Resultados semelhantes sobre o favorecimento da adesão de *P. fluorescens* em superfícies de PVC foram encontrados por CHAVES (2004). Esse estudo relatou que a interação entre a bactéria e a superfície foi favorável, apresentando $\Delta G_{adesão}^{TOT} = - 5,90 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$.

Os resultados da avaliação termodinâmica explicam a elevada concentração de células de *P. fluorescens* aderidas na tubulação de PVC. Para cada suspensão bacteriana em MMS com 10^7 a $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ que circulava no sistema ao final de cada dia de experimento, cerca de $1 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ estavam no biofilme após seis dias de sua formação. No entanto, para cada suspensão com 10^4 oocistos $\cdot\text{mL}^{-1}$ circulada na tubulação sem o biofilme, somente foi detectado cerca de $1 \text{ oocisto}\cdot\text{cm}^{-2}$ da superfície avaliada.

Tabela 5 - Valores da energia livre total de adesão entre a superfície de PVC (1) e *P. fluorescens* ATCC 13525 e, ou *C. parvum* (2)

Interação	γ_{12}^{LW} *	$\Delta G_{adesão}^{TOT}$ *
<i>P. fluorescens</i> e Tubulação de PVC	34,38	- 21,89
<i>C. parvum</i> e Tubulação de PVC	44,19	- 14,29
<i>P. fluorescens</i> , <i>C. parvum</i> e Tubulação de PVC	61,45	- 28,56

* Valores expressos em $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$.

4.6. Controle de biofilmes de *P. fluorescens* e de oocistos de *C. parvum* aderidos em tubulação de PVC pelo surfactante cloreto de benzalcônio

Houve diferença ($P < 0,05$) no número de reduções decimais (RD) de oocistos de *C. parvum* e de células de *P. fluorescens* nas diferentes concentrações do surfactante avaliadas nesse estudo.

As concentrações de soluções de cloreto de benzalcônio testadas resultaram em um decréscimo gradual do número de células e de oocistos aderidos na tubulação de PVC. Portanto, foi observado um aumento ($P < 0,05$) no número de RD de ambos os microrganismos à medida que os mesmos foram submetidos a tratamentos com soluções surfactantes em concentrações mais elevadas (Figura 15).

Foram encontrados valores de RD semelhantes de *C. parvum* e *P. fluorescens* quando as soluções surfactantes foram aplicadas a esses microrganismos em biofilme em concentrações mais baixas, como $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 15). Contudo, em concentrações iguais e superiores a $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, observou-se que o número de RD de *C. parvum* foi sempre inferior ao número de RD de *P. fluorescens* (Figura 15). Essa diferença de RD entre oocistos de protozoários e células bacterianas foi constatada, por exemplo, quando foi realizada a aplicação de cloreto de benzalcônio na concentração de $2200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, na qual foi possível obter RD de 2,65 e 3,86 ciclos logarítmicos nos números de *C. parvum* e de *P. fluorescens* (Figura 15), respectivamente, o que demonstra uma diferença de 1, 21 ciclos logarítmicos. Uma justificativa para esse resultado pode ser devido à menor adesão de oocistos, já constatada nesse experimento, em relação ao elevado número de células bacterianas presentes no biofilme formado na tubulação de PVC.

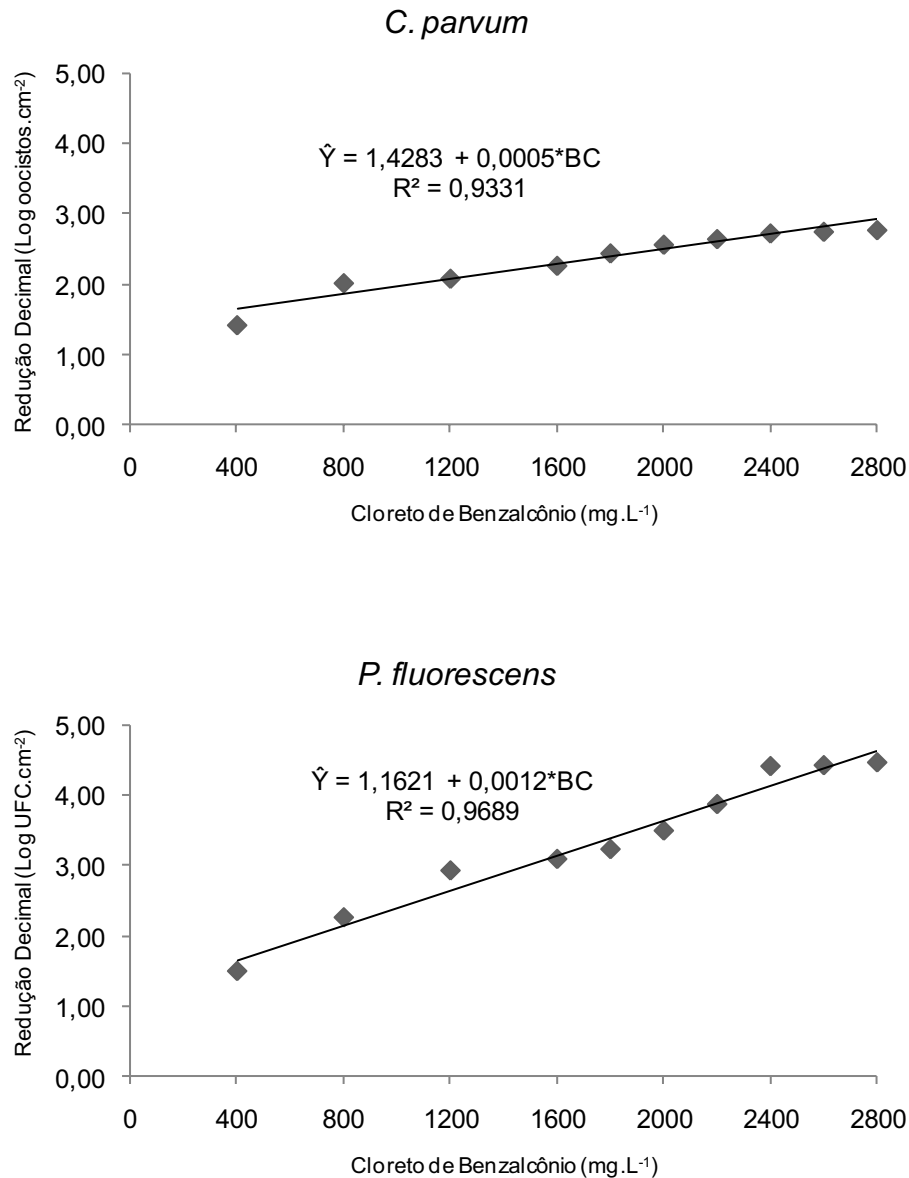


Figura 15 - Redução decimal de oocistos de *C. parvum*, e de biofilmes de *P. fluorescens*, expressos em log oocistos·cm⁻² e log UFC·cm⁻², respectivamente, aderidos em tubulação de PVC a 25 °C após tratamentos com dez concentrações de Cloreto de Benzalcônio durante 10 min de contato. *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05).

Os maiores números de RD de *P. fluorescens* após aplicação das soluções surfactantes podem ser também atribuídos ao modo de ação do cloreto de benzalcônio sobre células bacterianas. Segundo McDonnell e Russell (1999), o modo de ação desse tipo de surfactante, pertencente ao grupo de surfactantes catiônicos, é atribuído à sua carga positiva, a qual forma uma ligação eletrostática com sítios da parede celular da bactéria carregados negativamente. Essas ligações criam situações de

estresse na parede celular, o que conduz a uma lise da mesma e a uma posterior morte da bactéria. Além disso, o cloreto de benzalcônio pode causar a morte celular pela desnaturação de proteínas, alteração e rompimento da parede celular e redução de entrada normal de nutrientes que sustentam a célula bacteriana. Dessa forma, constata-se que há justificativas para a ação do surfactante sobre células bacterianas.

Ainda pouco é conhecido sobre a ação do cloreto de benzalcônio sobre os oocistos. *C. parvum* é um microrganismo muito resistente com capacidade de sobreviver em condições adversas. Ao contrário da maioria das bactérias, esse protozoário desenvolveu um estágio de dormência, fisiologicamente distinto, como parte do seu complexo ciclo de vida, na forma de oocisto. Este estágio de oocisto permite que o organismo permaneça viável, mas dormente, esperando a oportunidade de infectar um hospedeiro susceptível e perpetuar o seu ciclo de vida nesse hospedeiro. Ao contrário dos esporos bacterianos, pouco é conhecido sobre a composição química dos oocistos e como essa composição está associada com a capacidade de sobrevivência do protozoário (MILLAR et al., 2002). Segundo Fayer (1997), a resistência de *C. parvum* a condições de estresse ambiental e a sanitização química é atribuída à parede do oocisto que é uma barreira protetora complexa que apresenta dupla camada de uma matriz composta de proteínas, lipídios e carboidratos.

Sabe-se que o protozoário possui carga negativa em sua superfície (SMITH e ROSE, 1990). Assim, é provável que a carga positiva do cloreto de benzalcônio tenha capacidade de reagir com algum componente da superfície do oocisto e causar dano. No entanto, esse mecanismo de ação ainda é desconhecido e a morte do protozoário pode não ocorrer devido à sua resistência às soluções químicas, como por exemplo, surfactantes e sanitizantes. Já foi provado que os oocistos são capazes de sobreviver por longos períodos e são resistentes a muitos agentes sanitizantes como compostos clorados, iodóforos, cloreto de benzalcônio e outros compostos à base de amônia quaternária (BARBEE et al., 1999; WEIR et al., 2002).

A Figura 16 mostra algumas fotomicrografias do número de *C. parvum* e *P. fluorescens* presentes na tubulação de PVC antes e após a aplicação de algumas soluções de cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações. Observou-se que o número de microrganismos aderidos diminuiu depois da utilização de diferentes concentrações de surfactante (Figura 16 b a 16 f) quando comparados ao tratamento controle (Figura 16 a).

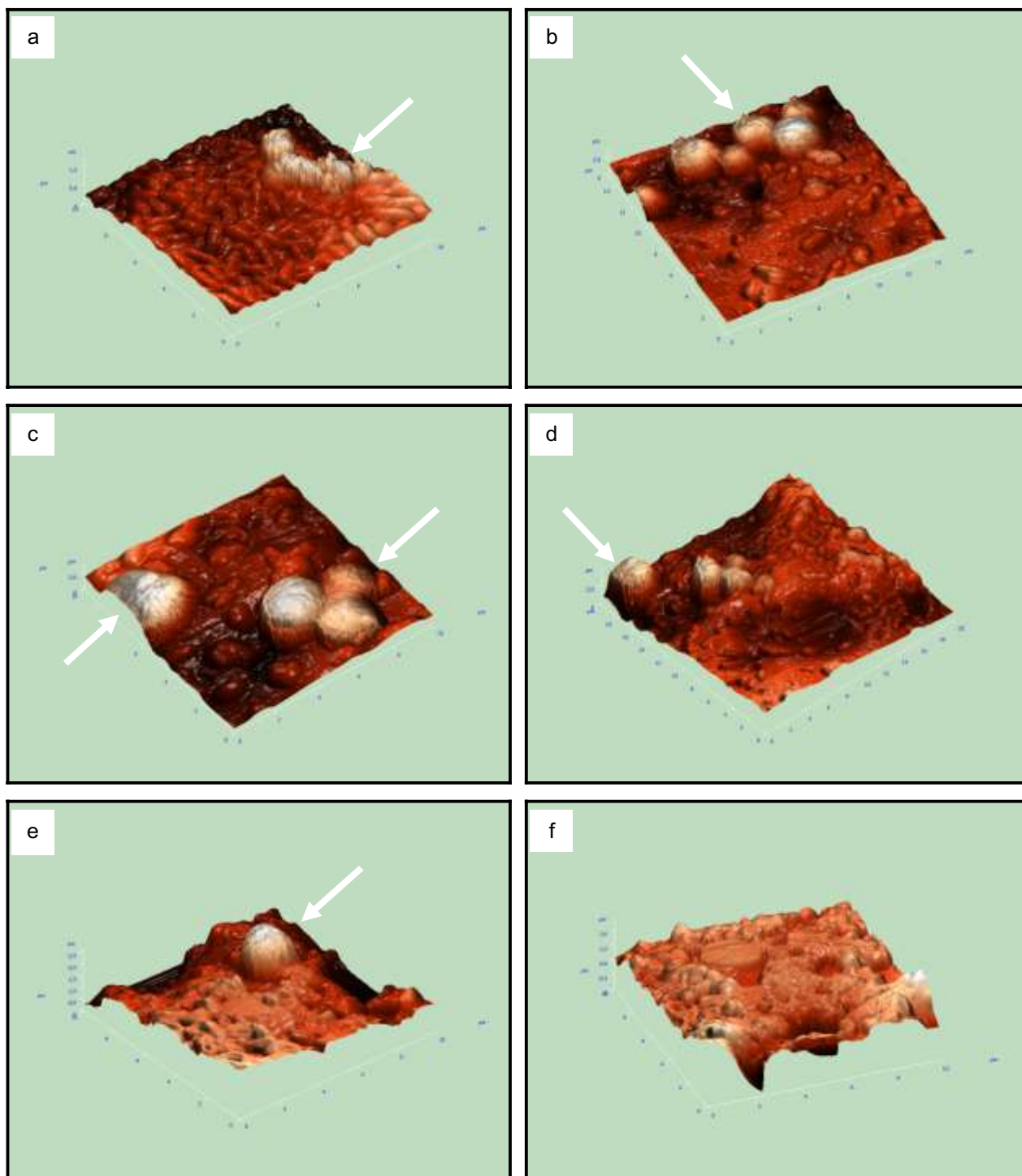


Figura 16 - Células de *P. fluorescens* em biofilmes e oocistos de *C. parvum* (setas) aderidos em tubulação de PVC utilizada para irrigação de hortaliças, avaliados por microscopia de força atômica, antes e após o tratamento com diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio: (a) Controle; (b) 1200 mg·L⁻¹; (c) 1800 mg·L⁻¹; (d) 2200 mg·L⁻¹; (e) 2600 mg·L⁻¹; (f) 2800 mg·L⁻¹.

Nesse experimento foi possível avaliar a remoção dos oocistos aderidos à tubulação por meio da aplicação do cloreto de benzalcônio. No entanto, nada se pode dizer sobre a inativação desses microrganismos, uma vez que não foi testada a sua

viabilidade. Assim, observou-se que o número de RD na população de *C. parvum* variou de 1,42 log oocistos.cm⁻² a 2,77 log oocistos.cm⁻², dependendo da concentração de surfactante utilizada (Figura 15). Abbaszadegan et al. (2006) demonstraram a eficiência de um produto comercial à base de compostos de amônia quaternária em filtros de sistema de abastecimento de água. Esses autores constataram que o produto comercial apresentou capacidade de remoção de 0,54 ciclos logarítmicos e capacidade de inativação de 1,19 ciclos logarítmicos na população de *C. parvum*. Esses dados sugeriram que, apesar da resistência dos oocistos ao surfactante, o composto de amônia quaternária teve capacidade de inativação microbiana, podendo ser usado em filtros para a diminuição da população de *C. parvum* em água.

Smith et al. (2002) relataram que o valor da concentração a partir da qual se inicia o processo de formação das micelas, também conhecida como concentração micelar crítica (CMC), do cloreto de benzalcônio é 1876 mg.L⁻¹. Verificou-se que o número de RD de *P. fluorescens* continuou a aumentar com mais intensidade do que quando comparado com o aumento do número de RD de *C. parvum* em concentrações acima dessa CMC (Figura 15).

Esses resultados mostraram que a maior eficiência desse surfactante para a retirada de ambos os microrganismos encontra-se em concentração elevada, acima da CMC. Assim, sugere-se a aplicação de soluções de cloreto de benzalcônio em concentrações em torno de 2800 mg.L⁻¹ para a remoção desses microrganismos em tubulação de PVC.

Dessa forma, a retirada dos microrganismos aderidos à superfície de PVC pode ser realizada por meio do uso de soluções surfactantes, como cloreto de benzalcônio, em concentrações suficientes para se obter um controle da contaminação microbiana dentro da tubulação de PVC utilizada para irrigação de hortaliças. Esse controle deve ser realizado de modo a retirar um maior número de microrganismos aderidos e evitar que as células bacterianas não removidas da tubulação continuem seu crescimento, principalmente na forma de biofilmes, facilitando a adesão de oocistos de *C. parvum*. Caso o controle não seja realizado de maneira eficiente, isso pode refletir em uma liberação de bactérias e protozoários para o líquido circulante, no caso a água utilizada na irrigação, o que poderá causar a diminuição da qualidade microbiológica das hortaliças e comprometimento da saúde do consumidor.

5. CONCLUSÃO

A quantidade de oocistos de *C. parvum* por cm² capturados pelo biofilme de *P. fluorescens* em tubulação de PVC foi maior do que os oocistos retidos após o aumento de seis vezes do fluxo do líquido circulante. Portanto, o aumento do fluxo foi importante para a remoção dos oocistos do protozoário.

Os oocistos de *C. parvum* não possuem boa capacidade de adesão à superfície de PVC quando estão em cultura pura no meio de circulação, o que permitiu concluir que o biofilme de *P. fluorescens* foi determinante para o aprisionamento do protozoário na tubulação utilizada para a irrigação devido a presença de exopolissacarídeos. Dessa forma, as interações existentes entre biofilme bacteriano e oocistos podem ter um papel importante na migração de *C. parvum* em sistemas de produção de hortaliças. Assim, é importante se controlar a contaminação por *P. fluorescens* em sistemas de abastecimento de água em hortas de alface.

A superfície da tubulação de PVC apresentou característica hidrofóbica de acordo com as medições dos ângulos de contato com a água e com os cálculos de energia livre de superfície. As superfícies de *P. fluorescens* e de *C. parvum* foram classificadas como hidrofílicas pela mesma técnica. Apesar dessas diferenças, as superfícies hidrofóbicas possuem capacidade de adesão em superfícies hidrofílicas.

A avaliação termodinâmica por meio da quantificação da energia livre total de interação indicou que a adesão de *P. fluorescens* na forma de biofilmes e de oocistos de *C. parvum* foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão}^{TOT} < 0$) em todas as condições avaliadas.

O uso de cloreto de benzalcônio para a remoção de biofilmes de *P.fluorescens* e de oocistos de *C. parvum* aderidos à tubulação de PVC promoveu um aumento do número de reduções decimais desses microrganismos à medida que foi aumentada a concentração do surfactante. Dessa forma, o controle desses microrganismos aderidos na tubulação pode ser realizado com soluções de cloreto de benzalcônio em concentrações em torno de 2800 mg·L⁻¹.

A presença dos oocistos aderidos no biofilme bacteriano pode contribuir para contaminação de hortaliças uma vez que os microrganismos podem ser desprendidos e transportados pelo fluxo de água durante a irrigação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN, M.; MONTEIRO, P.; OUWENS, R. N.; RYU, H.; ALUM, A. Removal and Inactivation of *Cryptosporidium* and Microbial Indicators by a Quaternary Ammonium Chloride (QAC) - Treated Zeolite in Pilot Filters. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 41, p. 1201-1210, 2006.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 412 p., 2008.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. *Biofouling*, v. 16, p. 17-27, 2000.

BARBEE, S. L.; WEBER, D. J.; SOBSEY, M. D.; RUTALA, W. A. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 49, p. 605-611, 1999.

BOE-HANSEN, R.; ALBRECHTSEN, H. J.; ARVIN, E.; JORGENSEN, C. Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. **Water Research**, v. 36, p. 4477-4486, 2002.

BUSSCHER, H. J. A. H.; WEERKAMP, H. C.; VAN DER MEI, A. W. J.; VAN PELT, H. P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 980-983, 1984.

CARELI, R. T.; LIMA, J. C.; SILVA, I. D.; ANDRADE, N. J. COLOMBARI, D. S. **Aspectos termodinâmicos na adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies de processamento de Alimentos**. Anais Digitais do XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos e do XV Seminário Latino Americano e do Caribe de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA, 2008.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. Universidade do Minho, 2004. 156 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Portugal, 2004.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. Biofilms: A Basis for an Interdisciplinary Approach. In: CHARACKLIS, W. G., MARSHALL, K. C. eds. **Biofilms**. New York: John Wiley and Sons, Inc, p. 3-15, 1990.

CHARACKLIS, W. G. Laboratory Biofilm Reactors. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. eds. **Biofilms**. New York: John Wiley and Sons, Inc, p. 55-89, 1990.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

COOK, N.; PATON, C. A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R. A. B.; BARKER, K.; SMITH, H. V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 215-221, 2006.

DAI, X. J.; HOZALSKI, R. M. Evaluation of microspheres as surrogates for *Cryptosporidium parvum* oocysts in filtration experiments. **Environmental Science & Technology**, v. 37, 1037-1042, 2003.

DOMOZYCH, D. S.; KORT, S.; BENTON, S.; YU, T. The extracellular polymeric substance of the green alga *Penium margaritaceum* and its role in biofilm formation. **Biofilms**, v. 2, p. 129-144, 2005.

DROZD, C.; SCHWARTZBROD, J. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1227-1232, 1996.

FAYER, R. C. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1997. 239 p.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Química Nova**, v. 29, p. 137-142, 2006.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, p. 36-43, 2007.

GILBERT, P.; EVANS, D. J.; EVANS, E.; DUGUID, L. G.; BROWN, M. R. W. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 72-77, 1991.

GILMOUR, A.; WILSON, A. B.; FRASER, T. W. Microbial Adherence to Food Contact Surfaces. In: DENYER, S. P.; GORMAN, S. P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control**. Oxford; Boston: Blackwell Scientific Publications, cap. 18, 352 p., 1993.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HSU, B. M.; HUANG, C. P. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potential of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 201, p. 201-206, 2002.

JOSHUA, G. W. P.; GUTHRIE-IRONS, C.; KARLYSHEV, A. V.; WREN, B. W. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v. 152, p. 387-396, 2006.

KACZMAREK, H.; KOWALONEK, J.; SZALLA, A.; SIONKOWSKA, A. Surface modification of thin polymeric films by air-plasma or UV-irradiation. **Surface Science**, v. 507, p. 883-888, 2002.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 37-57, 2004.

KERR, C. J.; OSBORN, K. S.; ROBSON, G. D. AND HANDLEY, P. S. The relationship between pipe material and biofilm formation in a laboratory model system. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 85, p. 29-38, 1999.

KUZNAR, Z. A.; ELIMELECH, M. *Cryptosporidium* oocyst surface macromolecules significantly hinder oocyst attachment. *Environmental Science & Technology*, v. 40, p. 1837-1842, 2006.

KUZNAR, Z. A.; ELIMELECH, M. Role of surface proteins in the deposition kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Langmuir**, v. 21, p. 710-716, 2005.

LANGMARK, J.; STOREY, M. V.; ASHBOLT, N. J.; STENSTROM, T. A. Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 706-712, 2005.

LI, X.; CHEN, G.; MA, Y.; FENG, L.; ZHAO, H.; JIANG, L.; WANG, F. Preparation of a super-hydrophobic poly (vinyl chloride) surface via solvent-nonsolvent coating. **Polymer**, v. 47, p. 506-509, 2006.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. Universidade do Minho, 2005. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Portugal, 2005.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-179, 1999.

MILLAR, B. C., FINN, M, XIAO, L., LOWERY, C. J., DOOLEY, J. S. G., MOORE, J. E. *Cryptosporidium* in foodstuffs – an emerging aetiological route of human foodborne illness. **Trends in Food & Technology**, v. 13, p. 168-187, 2002.

MULLER, A. P. B.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in raw and drinking waters in São Paulo City, Brazil. In: World Water Congress of the International Water association, 2000, Paris. **Annals of I World Water Congress of the International Water association**, p. 108, 2000.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Comparison of the adhesion ability of different Salmonella Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2352-2356, 2006.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa. 301 p., 2001.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W.; HADDAD, A.; SESSO, A.; SILVEIRA, M.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; SOUTO-PADRÓN, T. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, v. 1, p. 71-79, 1989.

SKRABER, S.; SCHIJVEN, J.; GANTZER, C.; HUSMAN, A. M. R. Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? **Biofilms**, v. 2, p. 105-117, 2005.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis. **Parasitology Today**, v. 6, p. 8-12, 1990.

SMITH, M. J.; FLOWERS, T.H.; COWLING, M.J.; DUNCAN, H.J. Method for the measurement of the diffusion coefficient of benzalkonium chloride. **Water Research**, v. 36, p. 1423-1428, 2002.

STOREY, M.; ASHBOLT, N. Persistence of two model enteric viruses (B4-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. **Water Science and Technology**, v. 43, p. 133-138, 2001.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 329-335, 2003.

TEUNIS, P. F. M.; HAVELAAR, A.H. Risk assessment for protozoan parasites. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 9, p. 122-146, 2002.

VALCARCE, M. B.; BUSALMEN, S. R.; SÁNCHEZ, S. R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 50, p. 61-66, 2002.

VAN DER MEI, H. C.; BOS, R.; BUSSCHER, H. J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 11, p. 213-221, 1998.

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity and Hydrophilicity of biosurfactans. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 2, p. 503-512, 1997.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hidrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VERRAN, J.; BOYD, R. D. The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: a review. **Biofouling**, v. 17, p. 59-71, 2001.

VERRAN, J.; ROWE, D. L.; BOYD, R. D. The effect of nanometer dimension topographical features on the hygienic surface of stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1183-1187, 2001.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WATNICK, P. I.; LAURIANO, C. M.; KLOSE, K. E; CROAL, L; KOLTER, R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 223-235, 2001.

WEIR, S. C.; POKORNY, N. J.; CARRENO, R. A.; TREVORS, J. T.; LEE, H. Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cell Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2576-2579, 2002.

WHITEHEAD, K. A.; COLLIGON, J. S.; VERRAN, J. The production of surfaces of dened topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 54, p. 143-151, 2004.

YEO, S. H.; CHUA, L. Y. Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* on magnetic surfaces. **Colloids and Surfaces**, v. 36, p. 75-80, 2004.