

PRISCILLA MACEDO LIMA

INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NATURAL E DE
FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA ADESÃO DE
Salmonella Enteritidis EM ALFACE DE CULTIVO
HIDROPÔNICO E CONVENCIONAL

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NATURAL E DE
FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA ADESÃO DE
Salmonella Enteritidis EM ALFACE DE CULTIVO
HIDROPÔNICO E CONVENCIONAL**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2008

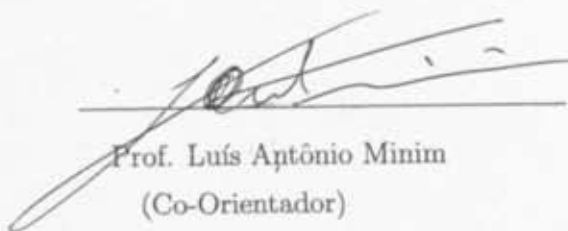
**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NATURAL E DE
FATORES FÍSICO-QUÍMICOS NA ADESÃO DE
Salmonella Enteritidis EM ALFACE DE CULTIVO
HIDROPÔNICO E CONVENCIONAL**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de outubro de 2008.



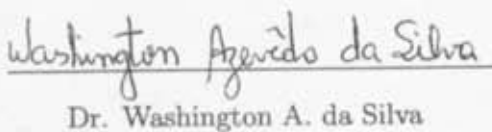
Prof. Sukarno O. Ferreira
(Co-Orientador)



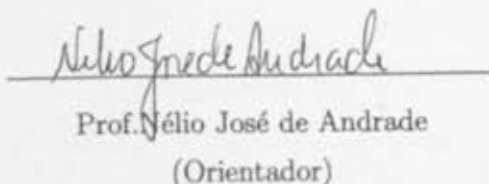
Prof. Luís Antônio Minim
(Co-Orientador)



Dr. Cleuber Antônio de Sá Silva



Dr. Washington A. da Silva



Prof. Nélcio José de Andrade
(Orientador)

Agradecimentos

A Deus, Pai de infinita bondade, que ilumina meus caminhos e está sempre presente em minha vida.

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

À Minha família, obrigada por vocês existirem. Obrigada por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Meus pais queridos obrigada pelo exemplo que cada um de vocês é para mim. Chel e Adalberto, obrigada pelo acolhimento em sua casa e carinho de sempre. Jam, agradeço a presença e apoio constante em todos os momentos. Cam e Dré, muito obrigada pela ajuda incondicional na estruturação da minha tese, por todos os momentos dispensados a mim, pela paciência e disponibilidade. Cam, você foi essencial (rs).

Ao meu amado noivo, pelo companheirismo, apoio, dedicação e amor. Agradeço pelas sábias palavras, ajuda, incentivo e por todos os momentos de felicidade durante todos esses anos.

Ao meu orientador, Nélcio José de Andrade, pela confiança, compreensão, incentivo e principalmente pela amizade, carinho e ensinamentos proporcionados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fape-ming), por contribuir no financiamento desta pesquisa.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira, pela valiosa ajuda, disponibilidade e atenção dispensadas.

Ao professor Luís Antônio Minim, pelas sugestões e esclarecimentos importantes.

À Prof. Miriam Teresinha dos Santos, pela disponibilização da cultura bacteriana.

À Dr. Cláudia Alencar Vanetti, pela contribuição e ensinamentos na realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente Pio, Geralda, Vaninha, Eliana e Juarez.

Aos produtores de alface que contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos.

Às minhas estagiárias, Dani Leocádio e Dani Lana, pela valiosa ajuda durante a realização deste trabalho.

A três amigas "campeãs", que conheci no decorrer do Mestrado e que desde o início acompanharam meu trabalho: Gê, Juninha e Rô. A primeira por ser alguém que tive grande afinidade, e que sempre pude contar com seu ombro amigo, com seu carinho e palavras alegres, e é claro com as divertidas caronas no seu chevetinho. A Rô, pela amizade, pela ajuda desde o início, sempre presente, sempre apoiando, incentivando e sem falar nas suas deliciosas receitas que tive o privilégio de saborear. A Júnia, agradeço pela amizade, pela alegria e por todas as nossas trocas de informações e os inesquecíveis momentos no Rio.

A Caio, Iarinha, Patrícia, Emiliane, Ana Márcia, Evellyn e Cida, pela agradável convivência, colaboração e amizade.

À minha sogra, "Tia Lene", meus cunhados Mari e Marcinho, pela torcida e carinho.

Às minhas amigas de longa data, Nessa e Karol, pela torcida e amizade.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e carinho.

Enfim, quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que foram solidárias, que torceram por mim.

Biografia

Lista de Figuras

Lista de PRISCILLA MACEDO LIMA, filha de Severino da Paz Lima e Lúcia Helena Macedo Lima, nasceu em Ilhéus, Bahia, em 15 de março de 1982.

Em setembro de 2005, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Em maio de 2006 ingressou no Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em outubro de 2008.

2. História da Literatura

2.1. Allan (Jornal de Notícias)

2.2. Ocorrências de Portugal na República Federal

2.3. Educação Literária

2.4. Agradecimentos

2.5. Referências Bibliográficas e Outras Importantes

2.5.1. Microbiologia Geral

2.5.1.1. História da Microbiologia

2.5.1.1.1. História da Microbiologia

2.5.1.1.2. Microbiologia da Indústria

2.6. História da Física Atômica

2.7. Microbiologia: Evolução da Vida

Índice

	Página
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1 Introdução	1
1.1 Contextualização	1
1.2 Objetivos	2
2 Revisão de Literatura	4
2.1 Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	4
2.2 Ocorrência de Patógenos em Vegetais Frescos	6
2.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis	7
2.4 Adesão Bacteriana	9
2.5 Fatores que Influenciam na Adesão Bacteriana	10
2.5.1 Microbiota Natural	10
2.5.2 Fatores Físico-químicos	12
2.5.2.1 Hidrofobicidade	13
2.5.2.2 Microtopografia da Superfície	15
2.6 Microscopia de Força Atômica	15
2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura	17

3	Material e Métodos	19
3.1	Amostras de Alface	19
3.2	Determinação da Microbiota Natural das Amostras de Alface	19
3.2.1	Preparo das Amostras	19
3.2.2	Contagem de aeróbios mesófilos	20
3.2.3	Contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras	20
3.2.4	Contagem de Coliformes a 35 °C e <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.5	Enumeração de Bactérias Lácticas	21
3.3	Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> sp. em Alfaces de Cultivo Convencional e Hidropônico	21
3.4	Adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis nas folhas de alface	22
3.4.1	Microrganismo e preparo da suspensão bacteriana	22
3.4.2	Preparo dos cupons de alface e adesão de <i>S. Enteritidis</i>	22
3.4.3	Enumeração de células aderidas	23
3.5	Caracterização Topográfica das Superfícies	23
3.5.1	Microscopia de Força Atômica	23
3.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	24
3.5.2.1	Preparo das Amostras	24
3.5.2.2	Desidratação das Amostras e Metalização com Ouro	24
3.6	Hidrofobicidade Qualitativa, Energia Livre de Superfície e Energia Livre de Adesão	25
3.6.1	Preparo das Células de <i>S. Enteritidis</i> para a Medição de Ângulos de Contato	25
3.6.2	Preparo das Superfícies de Alface para a Medição de Ângulos de Contato	26
3.6.3	Ângulos de contato e Avaliação Qualitativa da Hidrofobicidade das Superfícies	26
3.6.4	Determinação da Energia Livre de Superfície	28

3.6.5	Determinação da Energia Livre Total de Adesão	30
3.7	Delineamento Experimental	30
<i>Lista de Figuras</i>		
4	Resultados e Discussões	32
4.1	Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> sp. em alface de cultivo hidropônico e convencional	32
4.2	Avaliação da Microbiota Natural de Alface de Cultivo Hidropônico e Convencional	32
4.3	Determinação do número de células de <i>S. Enteritidis</i> nas folhas de alface e influência da microbiota natural na adesão	34
4.4	Avaliação da adesão e caracterização topográfica das superfícies por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.5	Avaliação da influência da topografia das superfícies na adesão por Microscopia de Força Atômica (MFA)	39
4.6	Influência da Hidrofobicidade na adesão	41
4.7	Avaliação da Energia Livre de Adesão	42
5	Conclusões	44
	Bibliografia	46

Lista de Figuras

1	Mecanismo teórico de vários estágios de adesão e formação de biofilmes	10
2	Definição do ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal.	14
3	Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica.	16
4	Membrana de acetato de celulose revestida por células de <i>Samonella</i> Enteritidis, visualizada por Microscopia de Força Atômica	26
5	Medição dos ângulos de contato na superfície de alface	27
6	Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo hidropônico observada por MEV.	37
7	Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo convencional observada por MEV.	37
8	Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo hidropônico com células de <i>S. Enteritidis</i> observada por MEV.	38
9	Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo convencional com células de <i>S. Enteritidis</i> observada por MEV.	38
10	Microtopografia da superfície de alface de cultivo hidropônico, em planos tridimensional e bidimensional realizada por MFA.	39
11	Microtopografia da superfície de alface de cultivo convencional, em planos tridimensional e bidimensional realizada por MFA.	39

Lista de Tabelas

- 1 Valores das componentes da tensão superficial dos líquidos a 20 °C ... 28
- 2 Médias dos logarítimos da contagem ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) da microbiota presente em alface de cultivo convencional e hidropônico. ... 33
- 3 Valores das médias da contagem de microrganismos, em $\log \text{UFC.g}^{-1}$, em alface sanitizada e sem sanitizar. ... 34
- 4 Médias dos Logarítimos do número de células aderidas de *S. Enteritidis* em alface de cultivo hidropônico e convencional. ... 35
- 5 Médias dos Logarítimos do número de células aderidas de *S. Enteritidis* em alface, sanitizada e sem sanitizar. ... 35
- 6 Parâmetros de rugosidade das superfícies de alface concencional e hidropônico medidos por Microscopia de Força Atômica. ... 40
- 7 Valores médios dos ângulos de contato (θ) determinados à temperatura 41
- 8 Valores das componentes de tensão superficial (γ^{LW} , γ^+ e γ^-) e grau de hidrofobicidade (ΔG_{SWS}) das superfícies de adesão e de *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076. ... 42
- 9 Valores da energia livre total de adesão entre *S. Enteritidis* ATCC 13076 (1) e a superfície de adesão (2), ΔG_{adesao}^{TOT} em mJ.m^{-2} 43

Resumo

LIMA, Priscilla Macedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008.
Influência da microbiota natural e de fatores físico-químicos na adesão de *Salmonella* Enteritidis em alface de cultivo hidropônico e convencional. Orientador: Nélcio José de Andrade. Co-orientadores: Sukarno Olavo Ferreira e Luís Antônio Minim.

A adesão de *Salmonella* Enteritidis em folhas de alfaces provenientes de cultivo hidropônico e convencional foi avaliada em razão da microbiota nativa, com ou sem sanitização com composto clorado orgânico e da rugosidade do vegetal, avaliada pela Microscopia de Força Atômica. Além disso, foram determinadas as hidrofobicidades das superfícies das folhas de alface e da *S. Enteritidis*, pelo ângulo de contato com a água e pela energia livre. Também, foi realizado estudo termodinâmico baseado na quantificação da energia livre total de interação para prever a adesão desse patógeno nas superfícies foliares. A presença de *Salmonella* sp. não foi observada em nenhuma das amostras de alfaces. A exceção da contagem de fungos filamentosos e leveduras, a alface de cultivo hidropônico apresentou menores contagens ($P < 0,05$) para mesófilos aeróbios, bactérias lácticas e coliformes a 35 °C. A sanitização com 200 mg.L⁻¹ de cloro residual total, pH 6,8, durante 15 min reduziu ($P < 0,05$) as contagens de todos os grupos microbianos, alterando assim a microbiota nativa da superfície das alfaces. A adesão de *S. Enteritidis* foi maior ($P < 0,05$) na alface hidropônica e em ambos os tipos de alfaces após o procedimento de sanitização ($P < 0,05$). As imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram que as superfícies foliares apresentaram características microfotográficas distintas e que os estômatos presentes nas superfícies serviram de entrada e abrigo para as células do patógeno. Os valores de rugosidade mostraram que a superfície da alface de cultivo hidropônico foi mais rugosa ($P < 0,05$), com média de 1211,2 nm. A alface de cultivo convencional apresentou uma rugosidade média de 293,3 nm. A análise qualitativa de hidrofobicidade revelou que a superfície *S. Enteritidis* foi hidrofílica e

que as superfícies de alfaces hidropônico e convencional, podem ser classificadas como hidrofóbica e levemente hidrofílica, respectivamente. Os valores das energias livres foram positivos ($\Delta G_{adesao} > 0$) para a superfície de alface de cultivo convencional, e para a superfície de *S. Enteritidis*, indicando superfícies hidrofílicas, enquanto para a alface oriunda do sistema hidropônico o valor da energia livre foi negativo ($\Delta G_{adesao} < 0$), ou seja, hidrofóbica. Nessa pesquisa os principais fatores envolvidos na adesão do patógeno foram a rugosidade das superfícies e microbiota competidora. A adesão de *S. Enteritidis* foi termodinamicamente desfavorável, independente da forma de cultivo ($\Delta G_{adesao} > 0$). Desse modo, a avaliação termodinâmica explica o baixo percentual de células de *S. Enteritidis* aderidas às superfícies foliares. Os resultados mostram a importância do processo de sanitização de vegetais e das práticas adequadas de produção e sugerem que a recontaminação é um importante fator a ser considerado. Nesse sentido, a preservação biológica deve ser considerada como uma medida adicional e não como uma substituição dos processos higiênico-sanitários. Além disso, o estudo dos fatores que envolvem a adesão bacteriana em superfícies de alimentos é de grande importância para o controle desse processo e obtenção de alimentos mais seguros do ponto de vista microbiológico.

Abstract

LIMA, Priscilla Macedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october, 2008. **Influence of the native microbiota and of physical-chemical factors in adhesion of *Salmonella* Enteritidis in lettuces of hydroponic and conventional systems.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: Sukarno Olavo Ferreira and Luís Antônio Minim.

Adhesion of *Salmonella* Enteritidis in lettuces leaves of hydroponic and conventional systems was evaluated in reason of the native microbiota, with or without sanitization with chlorinated organic compound and vegetal roughness, using Atomic Force Microscopy. Besides, surfaces hydrophobicities of the lettuce leaves and *S. Enteritidis* were determined, through water contact angle and free energy. Also, a thermodynamic study was accomplished based on the quantification of the total free energy of interaction of the surfaces to foresee the pathogen adhesion on the leaf surfaces. The presence of *Salmonella* sp. was not observed in none of the lettuces samples. Except filamentous fungi and yeasts counts, the lettuce cultivars grown hydroponically presented smaller counts ($P < 0,05$) for aerobic mesophilic, lactic bacteria and coliforms at 35 °C. Sanitization with 200 mg.L⁻¹ of total residual chlorine, pH 6.8, during 15 min reduced ($P < 0,05$) the counts of all of the microbial groups, altering the native microbiota of the lettuces surface. The adhesion of *S. Enteritidis* was larger ($P < 0,05$) in the hydroponic lettuce and in both types of lettuce after the sanitization procedure ($P < 0,05$). Images obtained by Scanning Electron Microscopy showed that the leaf surfaces presented different microphotographic characteristics and that the present stomats in the surfaces served as entrance and shelter for the pathogen cells. The roughness values showed that the surface of lettuce cultivars grown hydroponically was more wrinkled ($P < 0,05$), with average of 1211.2 nm. The lettuce of conventional cultivation presented a medium roughness of 293.3 nm. The qualitative analysis of hydrophobicity revealed that

the surface *S. Enteritidis* was hydrophilic and that the surfaces of the hydroponic and conventional lettuces can be classified as hydrophobic and slightly hydrophilic, respectively. Free energies values were positive ($\Delta G_{sws} > 0$) for the surface of conventional cultivation lettuce, and for *S. Enteritidis* surface, indicating hydrophilic surfaces, while for the lettuce cultivars grown hydroponically the value of the free energy was negative ($\Delta G_{sws} < 0$), in other words, hydrophobic. The main factors involved in the adhesion of the pathogen in this research were surfaces roughness and competitor microbiota. Adhesion of *S. Enteritidis* to the leave surfaces was thermodynamically unfavorable, independent of the cultivation way ($\Delta G_{adesao} > 0$). Thus, the thermodynamic evaluation explains the low number of *S. Enteritidis* cells adhered to the leave surfaces. Results show the importance of the vegetables sanitization process and of the appropriate production practices and suggest that the recontamination is an important factor to be considered. In that sense, the biological preservation should be considered as an additional measure and not like a substitution of the hygienic-sanitariums processes. Besides, the study of the factors that involve the bacterial adhesion in foods surfaces is of great importance for the control of this process and in the obtaining of safe foods from the microbiological point of view.

1 Introdução

1.1 Contextualização

Mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores modernos, na busca por dietas mais saudáveis, têm gerado um aumento na demanda por produtos frescos, mais naturais e menos processados, com uma maior manutenção de parâmetros de qualidade sensorial e nutricional. Os vegetais frescos, em particular a alface, tem se tornado um dos alimentos mais consumidos no Brasil.

A alface tem grande participação na alimentação dos brasileiros constituindo-se na mais popular hortaliça, devido a sua qualidade sensorial e nutritiva, como também pela facilidade de aquisição e produção durante todo o ano, destacando-se principalmente, como fonte de vitaminas e sais minerais.

O cultivo da alface vem sendo praticado na forma tradicional, hidropônica e orgânica, que apresentam características diferenciadas na produção, podendo influenciar nas propriedades desta hortaliça. Essas possíveis diferenças oriundas das distintas formas de cultivo podem gerar uma microbiota natural específica, assim como particularidades relacionadas à capacidade de adesão de microrganismos patogênicos na superfície dessa hortaliça.

A produção de vegetais, principalmente os consumidos na forma crua como a alface, requer cuidados rigorosos no que se refere às condições de cultivo. Tais alimentos podem, facilmente, ser contaminados por práticas inadequadas de adubação e irrigação, podendo trazer problemas à saúde dos consumidores por tornarem-se veículos de microrganismos potencialmente patogênicos. Além das contaminações por solo e água poluída, os vegetais são passíveis de serem contaminados no transporte e armazenamento, ou ainda, durante a manipulação, como por exemplo, no preparo de saladas ou produtos minimamente processados. Dentro deste contexto, nos últimos anos, frutas e vegetais frescos, incluindo a alface, têm sido iden-

tificados como veículos de microrganismos patogênicos, como *Salmonella*, sendo alvo de grande preocupação por parte dos órgãos de saúde pública. O gênero *Salmonella* é responsável pela febre tifóide, paratifóide e gastroenterites agudas e severas em humanos e, portanto, sua presença não é tolerada nos produtos alimentícios.

A contaminação de vegetais envolvendo deterioração e surtos de doenças de origem alimentar pode estar relacionada com o processo de adesão bacteriana nas suas superfícies, o qual é influenciado por diversos fatores físico-químicos e microbiológicos. A microbiota natural dos vegetais pode apresentar propriedades inibitórias contra a adesão por patógenos, e, portanto, via competição ou antibioses, funcionar como obstáculo para crescimento e sobrevivência desses microrganismos.

Hidrofobicidade da superfície e cargas eletrostáticas têm sido propostas como as principais propriedades físico-químicas determinantes da adesão bacteriana, representando papel relevante nesse processo, tanto em superfícies inertes para processamento de alimentos, quanto em superfícies de alimentos. Muitos pesquisadores também apontam a topografia da superfície como fator de grande influência no processo de adesão.

Maiores informações a respeito dos fatores envolvidos no mecanismo de adesão bacteriana em superfícies de alimentos são de grande importância para o controle do crescimento e da sobrevivência de patógenos. Tais conhecimentos podem contribuir para a adoção de estratégias de intervenção que possam afetar a interação entre microrganismos e superfície de alimentos, impedindo dessa forma, que o processo de adesão se estabeleça, a fim de garantir a inocuidade desses alimentos.

1.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi adquirir maiores conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos no processo de adesão de *Salmonella* Enteritidis em superfícies de alfaces, visando contribuir no controle da ocorrência desses microrganismos para obtenção de alimentos seguros sob o aspecto microbiológico. Além disso, como objetivos específicos pode-se citar:

- Avaliar a microbiota natural de alfaces cultivados pelo sistema convencional e hidropônico;
- Avaliar a influência da microbiota natural sobre a adesão de *S. Enteri-*

tidis em alfaces de diferentes formas de cultivo;

- Estudar os mecanismos de adesão de *S. Enteritidis* em amostras de alface, fundamentada em conceitos de físico-química de superfície, com enfoque na hidrofobicidade e energia livre das interações superfície/microrganismo;

- Caracterizar a superfície foliar das amostras de alface, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA), avaliando a influência da topografia na adesão bacteriana.

2.1 Alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface é considerada uma das hortaliças mais utilizadas para salada, possuindo grande importância na alimentação, devido ao grande volume ingerido e ao fato de ser fonte rica em vitaminas, minerais e fibras. Devido ao seu baixo valor calórico, é considerada uma ótima opção para quem busca perder peso. A alface é considerada uma das hortaliças mais consumidas no mundo, sendo produzida em grande quantidade em vários países, sendo o Brasil o principal produtor mundial (VIEIRA *et al.*, 2002). Além disso, a hortaliça é considerada saudável por apresentar propriedades de grande importância nutricional e saúde, apresentando uma fonte de consumo de lactuca por pessoa (VILLAS BOAS *et al.*, 2002).

Apresenta crescimento rápido e é considerada uma das hortaliças mais consumidas. A alface é considerada uma das hortaliças mais utilizadas no mundo, sendo produzida em grande quantidade em vários países, sendo o Brasil o principal produtor mundial (VIEIRA *et al.*, 2002). Além disso, a hortaliça é considerada saudável por apresentar propriedades de grande importância nutricional e saúde, apresentando uma fonte de consumo de lactuca por pessoa (VILLAS BOAS *et al.*, 2002).

Quando é utilizada para salada, a alface é considerada uma das hortaliças mais consumidas. A alface é considerada uma das hortaliças mais utilizadas no mundo, sendo produzida em grande quantidade em vários países, sendo o Brasil o principal produtor mundial (VIEIRA *et al.*, 2002). Além disso, a hortaliça é considerada saudável por apresentar propriedades de grande importância nutricional e saúde, apresentando uma fonte de consumo de lactuca por pessoa (VILLAS BOAS *et al.*, 2002).

Quando é utilizada para salada, a alface é considerada uma das hortaliças mais consumidas. A alface é considerada uma das hortaliças mais utilizadas no mundo, sendo produzida em grande quantidade em vários países, sendo o Brasil o principal produtor mundial (VIEIRA *et al.*, 2002). Além disso, a hortaliça é considerada saudável por apresentar propriedades de grande importância nutricional e saúde, apresentando uma fonte de consumo de lactuca por pessoa (VILLAS BOAS *et al.*, 2002).

2 Revisão de Literatura

2.1 Alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface encontra-se como uma das hortaliças mais vendidas para consumo cru, sendo bastante utilizada na confecção de sanduíches, decoração de pratos, saladas, além do produto pronto para consumo, na forma de hortaliça minimamente processada. Devido ao seu baixo valor calórico qualifica-se para diversas dietas, o que favorece grandemente o seu consumo de uma maneira geral, constituindo-se em componente imprescindível das saladas dos brasileiros (FERNANDES et al., 2002). Além disso, é hortaliça tradicionalmente cultivada por pequenos produtores, sendo de grande importância econômica e social, culminando como ponto de agregação do homem e o campo (VILLAS BOAS et al., 2004).

Apresenta propriedades tranqüilizantes, com alto conteúdo de vitaminas A, B e C, além de cálcio, fósforo, potássio e outros minerais (VIGGIANO, 1999), destacando-se o elevado teor de pró-vitamina A, que pode alcançar até 4.000 UI em 100 gramas de folhas verdes (GADELHA et al., 2003).

Quanto à sua estrutura, a alface é uma planta herbácea delicada, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas por sua vez são amplas e crescem em volta do caule (em roseta), podendo ser lisas ou crespas. Conforme o tipo de cultivar, a coloração pode ocorrer em vários tons de verde e roxo (FILGUEIRA, 2000).

O cultivo da alface vem sendo praticado na forma tradicional, hidropônica e orgânica, que apresentam características diferenciadas na produção, podendo influenciar nas propriedades desta hortaliça (MIYAZAWA et al., 2001). Em culturas convencionais os vegetais crescem no solo com aporte adequado de nutrientes e água. Para uma melhor produção, fertilizantes são freqüentemente utilizados (GUADAGNIN et al., 2005).

A agricultura orgânica surge como alternativa de produção à agricultura altamente mecanizada e rica em insumos industriais, que caracterizam o cultivo tradicional. O cultivo orgânico pode ser definido como "sistema de produção que evita ou exclui o uso de pesticidas ou agrotóxicos, fertilizantes de composição sintética, reguladores de crescimento ou outros agentes contaminantes" (HAMER-SCHMIDT, 1998).

A hidroponia (hydro = água e ponos = trabalho) é a ciência de cultivar plantas sem solo, onde as raízes recebem uma solução nutritiva balanceada contendo água e todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta. Apesar de ser uma técnica relativamente antiga, foi mundialmente consolidada no final da década de 80, inclusive no Brasil, onde, nos últimos anos, apresentou uma grande expansão, sendo comum encontrar produtos hidropônicos em supermercados de grandes centros consumidores (TEIXEIRA-YAÑEZ, 2000).

Dentre os fatores que contribuíram para uma significativa expansão da hidroponia encontram-se: a produção de hortaliças de ótima qualidade; melhor ergonomia pelo uso de bancadas; melhor aproveitamento de espaço físico, por permitir cultivos sucessivos; a menor incidência de pragas e doenças e, portanto, menor aplicação de tratamentos fitossanitários; maior tempo de vida útil para a comercialização do produto; o melhor controle do meio nutritivo para o crescimento das plantas e o aproveitamento de água e nutrientes (RODRIGUES, 2002; FURLANI, 1996).

Na hidroponia, a qualidade da água é fundamental, pois nela estarão dissolvidos os nutrientes essenciais para a nutrição das plantas. Dessa forma, é importante o controle microbiológico e químico que contribua para obtenção de uma água de excelente qualidade. Atualmente, alguns produtores utilizam água proveniente da rede pública de abastecimento, mas, a grande maioria, possui poços artesianos ou semi-artesianos para a captação da água utilizada no sistema hidropônico (BAPTISTA, 2007).

O cultivo sem solo proporciona um bom desenvolvimento das plantas e altas produtividades quando comparado ao sistema tradicional de cultivo no solo, uma vez que, protege a hortaliça contra fatores adversos do meio ambiente, como chuvas, geadas, ventos fortes e outros (SANTANA et al., 2006).

No Brasil, as principais culturas produzidas sob hidroponia são: alface, abobrinha, aipo, agrião, cebolinha, manjeriço, menta, morango, pepino, pimentão,

rúcula, salsa e tomate. Entretanto, a alface perfaz a preferência de 90% dos hidroponicultores, pois apresenta ciclo de vida curto, alta produtividade e ampla aceitação no mercado consumidor (FURLANI, 1996).

2.2 Ocorrência de Patógenos em Vegetais Frescos

A incidência das doenças veiculadas por alimentos vem aumentando de forma considerável, devido a vários fatores que incluem: mudanças no estilo de vida da população, que tem dedicado um menor tempo ao preparo de suas refeições, preferindo consumir alimentos já prontos; o modismo, que prefere alimentos crus ou minimamente processados com características próximas às dos *in natura*, e o aumento da população de grupos considerados de risco formados principalmente por idosos e indivíduos imunocomprometidos (LANDGRAF, 2002).

Independentemente do sistema de cultivo, o consumo de vegetais *in natura* constitui um importante meio de transmissão de várias doenças infecciosas. Dentre esses alimentos, as hortaliças folhosas se destacam como um dos veículos de contaminação mais significativos (NÓBREGA, 2002).

Mudanças em práticas agrônômicas ou de processamento, preservação, embalagem, distribuição e comercialização dos alimentos têm sido responsabilizadas pelo aumento no número de surtos ou infecções causadas por patógenos veiculados por vegetais. Tais alterações incluem o uso de esterco animal como fertilizante que não sofreu compostagem, 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. Além disso, na indústria de alimentos, equipamentos e manipuladores podem atuar como vetores potenciais para veiculação de patógenos em frutas e vegetais (BEUCHAT, 2002; BEUCHAT, 1995).

Bactérias patogênicas, como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*; vírus como os da hepatite A e Norwalk; e parasitas, como *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium parvum*, são de grande importância para a saúde pública e estão relacionados com surtos de infecção alimentar em razão do consumo de frutas e hortaliças frescas contaminadas (BEUCHAT, 2002).

De acordo com Takayanagui et al. (2000), em Ribeirão Preto, SP, hortas

produtoras de verduras apresentaram uma elevada concentração de coliformes fecais, presença de *Salmonella* sp e de vários enteroparasitas.

Oliveira et al. (2004) pesquisando as condições microbiológicas e parasitológicas de alfaces comercializadas em Salvador, BA, segundo diferentes sistemas de cultivo (hidropônico, orgânico e tradicional), evidenciaram que as alfaces provenientes do cultivo orgânico apresentaram o maior grau de contaminação por enteropatógenos, seguida do cultivo tradicional e hidropônico.

2.3 *Salmonella* Enteritidis

Atualmente é comumente aceito que o consumo de frutas e vegetais *in natura* é um fator de risco para infecção por patógenos entéricos. Uma variedade de frutas e vegetais têm sido implicada em infecção por *Salmonella*, mais frequentemente alface, melão e tomates. Exemplos recentes de surtos relacionados com produtos frescos incluem casos envolvendo *Escherichia coli* O157:H7 (espinafre, alface) e *Salmonella* Typhimurium (tomates, alface) (HEATON e JONES, 2007).

O gênero *Salmonella* é responsável por febre tifóide, paratífóide e gastroenterites agudas e severas em humanos e, portanto, sua presença não é tolerada nos produtos alimentícios. *Salmonella* sp. são os agentes etiológicos mais associados com infecção em produtos frescos, isolados em 48% dos casos entre 1973 e 1997 nos Estados Unidos (SIVAPLASINGHAM et al., 2004) e em 41% dos casos durante 1992 e 2000, no Reino Unido (HEATON e JONES, 2007).

Salmonelas são caracterizadas por pequenos bastonetes Gram-negativos, não-esporulados, amplamente distribuídos na natureza e têm o homem e os animais domésticos como seus principais reservatórios. Doenças alimentares causadas por *Salmonella* resultam da ingestão de alimentos contendo um número significativo de linhagens do gênero (JAY, 2005).

A dose infecciosa para voluntários saudáveis foi estimada em, aproximadamente, 10^6 células por grama. Entretanto, em alguns surtos associados a alimentos sólidos, envolvendo este patógeno, a dose infecciosa foi inferior a 10^2 células. Esses alimentos oferecem uma superfície adequada para a fixação do patógeno tornando-o menos susceptível às defesas do organismo hospedeiro, como o pH baixo do suco gástrico. Portanto, a dose infecciosa de um agente patogênico entérico de-

pende, entre outros fatores, de sua capacidade para resistir a esse pH (GAWANDE e BHAGWAT, 2002).

É uma bactéria de ampla ocorrência em animais e, no ambiente, as principais fontes são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas. A doença geralmente é contraída através do consumo de alimentos contaminados de origem animal, principalmente a carne bovina, a carne de aves, os ovos e o leite. Os vegetais contaminados com esterco também têm sido implicados na transmissão (SILVA et al, 2007).

Algumas mudanças ocorreram na taxonomia da *Salmonella*. Embora cientistas microbiologistas de alimentos e epidemiologistas considerem os 2.324 sorovares como se cada um fosse uma espécie, o esquema de classificação mais recente propõe a divisão do gênero em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *Houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*.

A maioria dos sorotipos responsáveis por causar enfermidades no homem e nos animais está contida na espécie *enterica*, subsp. *enterica*. Existem, atualmente, 2.324 sorotipos de *Salmonella*, dos quais 1.387 pertencem a esta subespécie, dentre eles o sorovar Enteritidis (JAY, 2005).

Nas últimas décadas, tem se observado um aumento expressivo na prevalência de *S. Enteritidis* tanto nos isolamentos a partir de espécimes clínicos quanto de alimentos (BÄUMLER et al., 2000). *S. Enteritidis* foi o sorovar mais freqüente nos Estados Unidos em 1994, representando 26% de todos os isolados de *Salmonella* (PATRICK et al., 2004).

No Brasil, resultados semelhantes com relação à prevalência de *S. Enteritidis* têm sido observados. Dentre as doenças causadas pela ingestão de alimentos, entre 1999 e 2002, foram notificados 176 surtos por *Salmonella* sp. (SILVA et al., 2005). Entre os sorovares mais freqüentemente isolados em episódios de infecção alimentar em humanos no país encontram-se *S. enterica* Enteritidis, Typhimurium, Bredeney e Tennessee (DIAS et al., 1999; JAKABI et al., 1999; ESPER et al., 1998). Segundo Castro et al. (2002), no estado de São Paulo, o isolamento clínico de *S. Enteritidis* apresentou aumento significativo e expressivo entre 1985 e 1999.

2.4 Adesão Bacteriana

A adesão microbiana é um fenômeno que está envolvido em várias doenças humanas e animais, na formação de placas dentárias, em processos industriais, dentre outros. Todos esses processos envolvem a interação entre microrganismos e algum tipo de superfície, que pode ser de materiais inertes ou biológicos (MESQUITA, et al., 2002).

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

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 à superfície de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade (pili superficiais, flagelos polares e etc.). Quando o microrganismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre forças atrativas e repulsivas (ex: interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals, impedimento estereoquímico, etc) 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 su-

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, 2005; KLAUSEN et al., 2003). Na figura 1, tem-se a ilustração das etapas do mecanismo de adesão bacteriana.

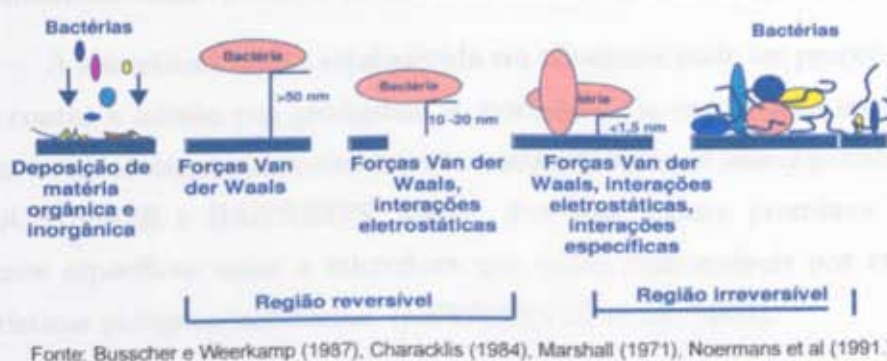


Figura 1: Mecanismo teórico de vários estágios de adesão e formação de biofilmes

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).

2.5 Fatores que Influenciam na Adesão Bacteriana

2.5.1 Microbiota Natural

Frutas e hortaliças apresentam microbiota natural que provém do ambiente, sendo influenciada pela estrutura da planta, técnicas de cultivo, transporte e armazenamento (PACHECO et al., 2002; ROSA e CARVALHO, 2000).

Todas as hortaliças possuem uma microbiota residente que normalmente resiste às baixas concentrações de carboidratos, proteínas e sais inorgânicos. Fungos e bactérias conseguem se multiplicar na superfície das hortaliças, entretanto, as bactérias se multiplicam mais rapidamente do que os fungos e leveduras. Por esta

razão, os grupos de microrganismos encontrados nos vegetais recém-colhidos são bastante variados (BRACKETT e SPLITTSTOESSER, 2001).

A microbiota de vegetais frescos constitui-se, basicamente, de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae e Pseudomonaceae, originárias da forma de cultivo (convencional ou hidropônica), água de irrigação, ar, insetos e animais (MURRAY et al., 1999). Bactérias lácticas também fazem parte da microflora desses alimentos. De acordo com Liao e Fett (2001) bactérias ácido lácticas e/ou leveduras foram consistentemente isoladas de cenoura, alface, e sementes germinadas.

A microbiota nativa estabelecida em alimentos pode ter propriedades inibitórias contra a adesão por patógenos, e, portanto, via competição ou antibiotes, funcionar como obstáculo para crescimento e sobrevivência de microrganismos patogênicos (SCHUENZE e HARRISON, 2002). Por isso, parece promissor encontrar organismos específicos entre a microflora que sejam responsáveis por expor estas características patógeno-inibitórias. (LEVERENTZ et al., 2006).

Mecanismos apresentados por microrganismos que interferem na adesão de patógenos incluem redução de pH, como no caso das bactérias ácido lácticas, ou pela competição por nutrientes e/ou espaço (BRASHEARS e DURRE, 1999; SPADARO et al., 2004; SPADARO et al., 2002). Bactérias do ácido láctico também apresentam atividade antagonista pela produção de bacteriocinas e, portanto, podem atuar como agentes de biocontrole (LAUKOVA et al., 2000; REUTER, 2001). O uso de bactérias lácticas como competidoras da microbiota deterioradora e patogênica é amplamente estudado em produtos cárneos e lácticos, mas só nas últimas décadas a sua aplicação em frutas e hortaliças minimamente processadas tem sido considerada (HOLZAPFEL et al., 1995).

Enquanto algumas leveduras poderiam agravar o problema de crescimento de patógenos alimentares em produtos processados, devido ao aumento de pH, por exemplo, certas leveduras e bactérias podem revelar ser úteis para segurança alimentar. Tais organismos podem diminuir a capacidade de microrganismos patogênicos em crescer em vista da competição por nutrientes (CAMPO e NGUYEN-THE, 2001; LIAO, 1999). A combinação de bactérias e leveduras pode também ser eficaz contra adesão de bactérias patogênicas (LIAO e FETT, 2001).

O aumento da segurança microbiológica em hortaliças pode ser alcançado com a utilização de barreiras adicionais como, por exemplo, a competição microbiana ou pela presença de bacteriocinas e outros compostos GRAS (*Generally Regarding*

as *Safe*) (HOLZAPFEL et al., 1995). Dentro desse contexto, a preservação biológica deve ser considerada como uma medida adicional e não como uma substituição das Boas Práticas de Manipulação.

2.5.2 Fatores Físico-químicos

Vários estudos têm descrito o fenômeno de adesão bacteriana em termos de parâmetros físico-químicos tais como hidrofobicidade (MARK et al., 1987; DAHLBACK et al., 1981), energia de superfície (BUSSCHER et al., 1984; ABSOLOM, et al., 1983), 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, 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 interagentes 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).

2.5.2.1 Hidrofobicidade

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; GIBBONS e ETHERDEN, 1983). Dentre essas forças inespecíficas, destacam-se as forças hidrofóbicas, as quais apresentam papel relevante na adesão de microrganismos, tanto em superfícies inertes para processamento de alimentos, 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 universalmente utilizada para determinar a hidrofobicidade de materiais (FOWKES et al., 1980).

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 2 (WOLF et al., 2006).

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).

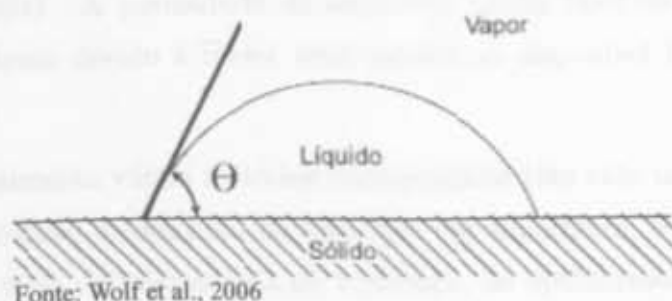


Figura 2: Definição do ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal.

van Oss e Giesse (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 de uma superfície imersa em água (ΔG_{sus}^{TOT}). A superfície é considerada hidrofóbica, quando a variação da energia global de interação entre as moléculas da superfície é atrativa ($\Delta G_{sus}^{TOT} < 0$), 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 ($\Delta G_{sus}^{TOT} > 0$). Dessa forma, quanto menor a energia livre global mais hidrofóbica é a superfície.

2.5.2.2 Microtopografia da Superfície

Além das propriedades superficiais de sólidos, existem outros fatores inerentes à morfologia das superfícies que podem ser determinantes na adesão, tais como a sua composição, rugosidade e porosidade (PEREIRA et al., 2000). A influência da rugosidade da superfície na adesão tem sido objeto de estudo de muitos trabalhos que a consideram como um fator determinante na adesão (QUIRYNEN et al., 1994).

O aumento da rugosidade da superfície tem sido associada com uma maior retenção microbiana. Este aumento dos níveis de adesão associado à rugosidade da superfície atribui-se à proteção das células no interior das irregularidades da superfície, permitindo que a adesão irreversível seja estabelecida mais facilmente, sendo por isso locais preferenciais para a colonização inicial.

Além disso, as irregularidades da superfície contribuem para um aumento da área superficial disponível para a adesão (VERRAN e MARYAN, 1997; QUIRYNEN et al., 1994). A porosidade da superfície sólida também contribui para o aumento da adesão devido à maior área superficial disponível (PEREIRA et al., 2000).

Atualmente vários métodos microscópicos têm sido usados para avaliar o processo de adesão e formação de biofilmes em superfícies, os quais podem ser realizados por meio de microscopia de contraste, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (MFA). A escolha da modalidade de microscopia a ser utilizada dependerá do aspecto de formação da adesão ou do biofilme que se deseja analisar (COSTA, 1999 e ZOTTOLA, 1997).

2.6 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica que permite obter imagens, em três dimensões, da topografia das superfícies, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas. É baseada em leis elementares da física e conta com a moderna tecnologia de semicondutores (WIESENDANGER, 1994).

A MFA mede a força proveniente da interação entre os átomos de uma fina agulha montada em um cantilever com os átomos da superfície em estudo. As

forças envolvidas em tais interações podem ser de diversos tipos, mas basicamente podem ser resumidas a dois tipos fundamentais: as forças de atração e as forças de repulsão que variam em função da distância entre o cantilever e a amostra (TEIXEIRA, 2003).

O microscópio de força atômica pode ser operado de diversos modos. Os modos de fazer as imagens, também chamados modos de varredura ou de operação, referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a ponteira e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. Estes modos podem ser classificados em três tipos: modo contato, modo não-contato e modo contato intermitente.

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos angstroms da superfície da amostra que se deseja estudar, e as forças entre o braço e a amostra são de origem repulsiva. No modo não-contato, o cantilever fica posicionado em distâncias da ordem de 100 angstroms da superfície em questão, e as forças entre o braço e a superfície da amostra são de origem atrativa. O modo contato intermitente ou semi-contato é similar ao modo não-contato, exceto que a agulha toca suavemente a superfície da amostra, sendo que esses toques não são contínuos (TEIXEIRA, 2003).

Durante o deslocamento da ponta do cantilever pela superfície o computador analisa, em cada posição na superfície, a força de interação entre a ponta de MFA e a amostra e traça o diagrama das alturas, construindo a topografia da amostra. Na figura 3 é mostrado um esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica.



Fonte: Paiva, 2005.

Figura 3: Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica.

A MFA permite a observação direta da arquitetura da superfície, consequentemente, a técnica de MFA pode trazer informações importantes sobre a morfologia da superfície de adesão. Com esse tipo de microscopia pode-se estudar além da topografia, propriedades mecânicas de superfícies, tais como: atrito, rugosidade, dureza, rigidez, elasticidade e resistência (HERRMANN et al., 1997).

A análise das imagens obtidas permite a determinação da rugosidade da amostra através dos valores de Ra e Rq . Ra é a rugosidade média, medida como a média das diferenças de altura observadas, enquanto Rq é a rugosidade quadrática média. Além disso, determina-se também a diferença de altura entre o pico mais alto e o vale mais profundo (Ry).

2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

As técnicas de microscopia eletrônica apresentam alto poder de resolução e comprimento de onda muito curto ($0,5\text{\AA}$) de feixe de elétrons, permitindo observar as amostras em aumentos maiores quando comparado com a microscopia óptica comum, sendo as mais indicadas quando se deseja analisar a interação microbiana na matriz do biofilme.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite alcançar aumentos muito superior ao da microscopia óptica. Dependendo do material pode atingir até 900.000 vezes, mas para a análise de materiais normalmente o aumento é da ordem de 10.000 vezes.

Na microscopia eletrônica a área ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons ao invés da radiação da luz. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações são emitidas tais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-X característicos, elétrons Auger, fótons, etc. Estas radiações quando captadas corretamente irão fornecer informações características sobre a amostra (topografia da superfície, composição, cristalografia, etc.) (MALISKA, 2008).

Os materiais biológicos, como a alface, por exemplo, geralmente são maus condutores de eletricidade e calor, por conseguinte, para serem observados ao microscópio eletrônico de varredura, devem ser transformados em materiais eletricamente condutivos. A cobertura desses materiais com uma fina camada de ouro

(cerca de 30 nm) ou uma liga de ouro e paládio é o meio utilizado para solucionar esse problema (PIZZOLITTO, 1997).

3. Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Departamento de Microbiologia de Alagoas e Higiene Industrial do Departamento de Parasitologia da UFPA, no Departamento de Parasitologia de Pernambuco e no Centro de Microbiologia e Moléculas da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

3.1. Amostras de Alfaca

Para obtenção das amostras de alfaca (Lycium sp.), que cresce, de forma espontânea e silvestre, foram coletadas amostras de alfaca, de maneira aleatória, em locais de ocorrência natural, em áreas de mata nativa, de altitude baixa, localizada a 100 metros de altitude, no município de São Paulo do Araguaia, Mato Grosso, de altitude baixa, localizada a 100 metros de altitude, no município de São Paulo do Araguaia, Mato Grosso.

3.2. Determinação da Microbiota Natural das Amostras de Alfaca

As amostras de alfaca foram coletadas de forma aleatória de acordo com a metodologia de Horta e Pires (1994) e analisadas (DNA) de acordo com Ochoa et al. (2004) for the Microbiological Examination of Food (Horta et al., 1994; 2004).

3.2.1. Preparo das Amostras

A alfaca foi moída em pó e colocada em sacos de papel de filtro e armazenada em ambiente seco e escuro. As amostras foram analisadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente em Pires e Horta (1994).

3 Material e Métodos

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

3.1 Amostras de Alface

Foram utilizadas amostras de alface (*Lactuca sativa*), tipo crespa, de cultivo convencional e hidropônico, adquiridas entre os meses de outubro a março, diretamente de produtores antes da comercialização, em hortas da cidade de Viçosa, Minas Gerais. As amostras foram transportadas e mantidas a 5 °C até o início das análises.

3.2 Determinação da Microbiota Natural das Amostras de Alface

As análises microbiológicas desta etapa foram realizadas de acordo com a metodologia da American Public Health Association (APHA), descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods (DOWNES e ITO, 2001).

3.2.1 Preparo das Amostras

A análise da microbiota foi realizada em folhas de alface de cultivo hidropônico e convencional, sanitizadas e sem sanitizar. As folhas externas das amostras de alface foram removidas e descartadas, sendo as folhas íntegras lavadas

em água corrente. Para as amostras sanitizadas, após a lavagem em água corrente, as folhas íntegras foram imersas em solução de dicloroisocianurato de sódio (Nippoclor®) com 200 mg.L^{-1} de cloro total em pH 6,1 durante 15 min. O cloro foi neutralizado por enxague em uma solução esterilizada de tiosulfato de sódio 0,5% por 5 min. Em seguida, as folhas foram retiradas assepticamente da solução, imersas em água destilada esterilizada e deixadas em repouso por um período de 20 min para drenar. Porções de 25 g das amostras de alface foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% utilizando *Stomacher* (Marconi®). A partir deste homogenato, diluições decimais adequadas para cada amostra foram realizadas.

3.2.2 Contagem de aeróbios mesófilos

Foi transferido 1 mL em duplicata, das respectivas diluições para placas de Petri esterilizadas e adicionados cerca de 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA)(Micro Med®). As placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. Transcorrido o tempo de incubação foi realizada a contagem das colônias e o resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC.g^{-1}).

3.2.3 Contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras

Foi inoculado 0,1 mL, em duplicata, das respectivas diluições sobre a superfície de Ágar batata dextrose acidificado (BDA) da marca Merck®. Com auxílio de alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio, até sua completa absorção. As placas foram incubadas, sem inverter, a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, por 3 a 5 d. Foi realizada a contagem das colônias e o resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC.g^{-1}).

3.2.4 Contagem de Coliformes a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e *Escherichia coli*

A contagem de coliformes totais e *E.coli* foi realizada utilizando-se placas PetrifilmTM, seguindo-se as recomendações da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). Foi inoculado 1 mL da amostra diluída no centro do filme interior da placa Petrifilm EC e em seguida, a amostra foi distribuída uniformemente pressionando-se um difusor plástico. As placas foram incubadas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. Foi realizada a contagem das colônias, enumerando-se como *E.coli* confirmada

as colônias azuis ou vermelho-azuladas associadas com gás, e como coliformes a 35 °C, colônias vermelhas associadas com gás. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC.g⁻¹).

3.2.5 Enumeração de Bactérias Lácticas

Foi transferido 1 mL das respectivas diluições para placas de Petri (em duplicata) e vertidos cerca de 15 a 20 mL de Ágar MRS (de Man, Rogosa & Sharpe)(Himedia®). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 48-72 h. Transcorrido o tempo de incubação foi realizada a contagem das colônias e o resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC.g⁻¹).

3.3 Avaliação da presença de *Salmonella* sp. em Alfices de Cutivo Convencional e Hidropônico

A pesquisa de *Salmonella* sp. nas amostras de alface foi realizada de acordo com o método tradicional de análise, segundo metodologia preconizada pela APHA, que compreende basicamente cinco etapas, descritas a seguir:

- Pré-enriquecimento: Pesou-se 25 g de cada uma das amostras de alface e em seguida, homogeneizou-se com 225 mL de caldo Lactosado (Merck®) em *stomacher* por 60 s. O homogenato obtido foi incubado a 37 °C por 18 h.

- Enriquecimento seletivo: Esta etapa foi realizada em caldo Rappaport Vassiliadis (Merck®) e em caldo Selenito Cistina (Merck®), inoculando-se 0,1 mL e 1 mL, respectivamente, de alíquotas do pré-enriquecimento, seguindo de incubação a 41 °C por 24 h.

- Plaqueamento seletivo-diferencial: O isolamento das colônias suspeitas de *Salmonella* foi feito a partir dos caldos de enriquecimento seletivo por meio de estrias na superfície dos meios Ágar *Salmonella-Shigella* (SSA)(Micro Med®), Ágar Verde Brillhante (BG)(Micro Med®) e Ágar Entérico de Hectoen (HE)(Himedia®). Em seguida as placas com os meios seletivos foram incubadas a 37 °C por 24 h.

- Provas Bioquímicas: Para verificar o perfil bioquímico das cepas de *Salmonella* foram selecionadas três colônias suspeitas crescidas nos meios seletivos usados conforme as características de *Salmonella* apresentadas em cada um deles e

transferiu-se para os meios Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)(Micro Med[®]), Ágar Lisina (LIA)(Difco[®]) e Caldo Uréia (Himedia[®]).

- Sorologia: A confirmação sorológica dos isolados com reações típicas de *Salmonella* nas provas bioquímicas foram realizadas por meio de teste de aglutinação em lâmina com anti-soro polivalente.

3.4 Adesão de *Salmonella* Enteritidis nas folhas de alface

A suspensão bacteriana e a adesão de *S. Enteritidis* em cupons de alface foram preparadas baseando-se na metodologia proposta por Takeuchi et al., 2000. Para a enumeração de células aderidas, o procedimento realizado foi baseado no descrito por Parizzi (1999).

3.4.1 Microrganismo e preparo da suspensão bacteriana

O estudo de adesão foi conduzido utilizando cultura de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, cedida pelo Departamento de Microbiologia de Alimentos da UFV. A cultura foi mantida em tubos Eppendorf de 1 mL contendo BHI (DifcoTM) à temperatura de -80°C . Para os estudos de adesão, a cultura foi ativada por três repicagens consecutivas em BHI e incubada à 37°C por 24 h. A cultura foi centrifugada a $1.900\times g$ por 15 min e os *pellets* foram lavados com água destilada esterilizada. A suspensão bacteriana foi preparada por ressuspensão dos *pellets* em água destilada esterilizada.

3.4.2 Preparo dos cupons de alface e adesão de *S. Enteritidis*

Foram realizados cortes das folhas de alface provenientes dos sistemas de cultivo hidropônico e convencional, sanitizadas e sem sanitizar, em cupons de dimensões de 2×2 cm, com auxílio de bisturi cirúrgico esterilizado. O procedimento de sanitização foi descrito no item 3.2.1. Cinco cupons de cada amostra de alface foram imersos separadamente em suspensão de *Salmonella* Enteritidis contendo aproximadamente $7 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ de *Salmonella* e incubados a 37°C por 12 h.

3.4.3 Enumeração de células aderidas

Após o período de incubação, os respectivos cupons foram retirados da suspensão bacteriana com o auxílio de pinça esterilizada e imersos em 10 mL de água destilada esterilizada por 1 min, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos contendo 10 mL de água destilada esterilizada e submetidos ao vórtex, durante 1 min, para a remoção de células sésseis. Diluições apropriadas foram preparadas e transferidas para placas de Petri contendo Ágar Hecktoen (Acumedia®) para enumeração de *S. Enteritidis*. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, procedendo-se em seguida, a contagem das colônias típicas. A quantidade de células aderidas por cm² de superfície foi calculada de acordo com a Equação 1, relacionando-se o volume do diluente usado para rinsagem (10 mL), a alíquota usada no plaqueamento (1 mL), a média da contagem das colônias expressa em UFC (M), a diluição realizada (D) e a área total dos cupons (40 cm²). Assim, tem-se:

$$UFC.cm^{-2} = 0,25 \times M \times D \quad (1)$$

3.5 Caracterização Topográfica das Superfícies

As microtopografias das superfícies das folhas de alface hidropônico e convencional foram avaliadas pela Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura.

3.5.1 Microscopia de Força Atômica

A microtopografia das amostras de alface foi avaliada pela técnica de microscopia de força atômica (MFA), usando o equipamento Universal SPM System Ntegra Prima/NT-MDT do Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV. As alfaces foram cortadas em pequenos pedaços e fixadas em cupons de vidro para posterior varredura da amostra.

As medidas foram executadas utilizando o modo denominado de semi-contato, 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, importante para amostras biológicas (FERREIRA e YAMANAKA, 2006). A rugosidade da amostra foi avaliada pelos valores de Ra e Rq. Ra é a rugosidade média, medida como a média das diferenças de altura observadas, enquanto Rq é a rugosidade quadrática média.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi também utilizada para observação da microtopografia das superfícies, além de permitir obter informações sobre a distribuição e morfologia das células na superfície.

3.5.2.1 Preparo das Amostras

Para observação da superfície foliar das amostras, cada tipo de alface foi submetido aos seguintes tratamentos: (1) controle (microbiota natural) e (2) microbiota natural e patógeno aderido. Nos dois casos, as folhas foram lavadas sob água corrente, colocadas para drenar por 20 min e em seguida, foram cortadas assepticamente em cupons de dimensões de 1×1 cm, com auxílio de bisturi esterilizado. As amostras inoculadas com *S. Enteritidis* (conforme item 3.4.2) foram removidos da suspensão e rinsados duas vezes consecutivas em água peptonada 0,1% esterilizada para remoção de células planctônicas ou fracamente aderidas.

3.5.2.2 Desidratação das Amostras e Metalização com Ouro

Para a fixação das células, os cupons de cada amostra de alface foram transferidos para solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) com pH 6,9 e deixados por 1 h à temperatura entre 20 – 25 °C. Em seguida, foi realizada uma rinsagem por 1 min com tampão fosfato de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. 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 dessecadas 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 é substituído por gás carbônico

na forma líquida, que ao atingir o ponto crítico evapora, ficando os cupons secos.

As amostras secas foram fixadas com fita dupla-face no suporte de porta-amostra do microscópio (*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 bons condutores elétricos (SILVEIRA, 1989). Posteriormente, os cupons foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 1430 VP, com aumentos variando de 100 x a 2000 x.

3.6 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 de alface de cultivo hidropônico e convencional para avaliar a influência da hidrofobicidade na adesão de *S. Enteritidis*.

3.6.1 Preparo das Células de *S. Enteritidis* para a Medição de Ângulos de Contato

O preparo das células para medição do ângulo de contato, foi realizado de acordo com metodologia descrita por van der Mei et al. (1998).

A cultura foi ativada por três repicagens consecutivas em BHI e incubada à 37 °C por 24 h. Foi realizada centrifugação das células a 1.900× g por 15 min e os *pellets* foram lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M. A suspensão bacteriana foi preparada por ressuspensão dos *pellets* em PBS 0,1 M. Posteriormente foi feita uma filtração da suspensão bacteriana de *S. Enteritidis* em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro.

Para padronizar o conteúdo de umidade, as membranas com a camada de células foram transferidas para placas de Petri contendo 1% de agar (p/v) e 10% de glicerol (v/v) (Isofar[®]), previamente preparadas, onde foram deixadas por 30 min.

Antes da medição dos ângulos de contato propriamente dita, foi realizada uma visualização por Microscopia de Força Atômica da membrana contendo

as células do microrganismo, com o objetivo de verificar se a membrana estava totalmente recoberta por *S. Enteritidis* (Figura 4). Em seguida, as membranas foram fixadas com fita adesiva de dupla face em lâmina de vidro para facilitar a leitura dos ângulos de contato.

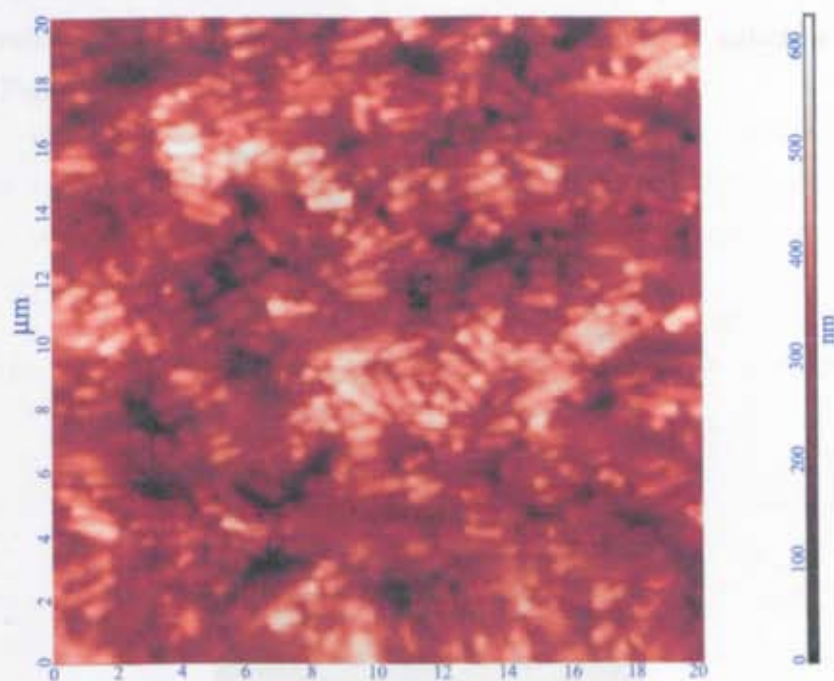


Figura 4: Membrana de acetato de celulose revestida por células de *Samonella* Enteritidis, visualizada por Microscopia de Força Atômica

3.6.2 Preparo das Superfícies de Alface para a Medição de Ângulos de Contato

Como já mencionado, as superfícies de adesão avaliadas foram alface convencional e hidropônica, sanitizadas e sem sanitizar. Os procedimentos de sanitização foram anteriormente descritos no item 3.2.1. Antes de serem submetidos à determinação dos ângulos de contato, os cupons (2×2 cm) das amostras de alface, foram fixados em lâminas de vidro com fita de dupla face.

3.6.3 Ângulos de contato e Avaliação Qualitativa da Hidrofobicidade das Superfícies

Todas as medições dos ângulos de contato foram efetuadas à temperatura de $20 - 25$ °C, utilizando-se três líquidos de diferentes polaridade: água, formamida

(Vetec[®]) e alfa-bromonaftaleno (Vetec[®]).

Os ângulos de contato foram determinados pelo método da gota sésil (Busscher et al., 1984), usando goniômetro de marca Kruss-GmH, Hamburg. As amostras a serem analisadas foram colocadas sobre um suporte do aparelho e uma gota de volume constante de 2 μL dos líquidos utilizados foi aplicada sobre a superfície (Figura 5).



Figura 5: Medição dos ângulos de contato na superfície de alface

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 através de uma câmara de vídeo e digitalizá-las em um computador pessoal onde está instalado um sistema automático de leitura. 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 VOGLER (1998), que sugere para valores de ângulos de contato com a água inferiores a 65° a superfície é considerada hidrofílica, enquanto que para ângulos de contato superiores a 65° a superfície é considerada hidrofóbica.

3.6.4 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, $\Delta G_{\text{int}}^{\text{TOT}}$ (Van Oss e Giese, 1995). A energia livre de superfície foi determinada através 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 ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)			
	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 2) para obtenção das três componentes da tensão superficial das superfícies avaliadas γ_S^{LW} , γ_S^+ , γ_S^- , dada por:

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

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

$$\gamma_S^{LW} = \frac{\gamma_1^{TOT}}{4} + (1 + \cos \theta)^2 \quad (3)$$

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 expressão:

$$\gamma_S^{TOT} = \gamma_S^{LW} + \gamma_S^{AB} \quad (4)$$

em que,

$$\gamma_S^{AB} = 2 \times \sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_S^-} \quad (5)$$

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}):

$$\Delta G_{sws}^{TOT} = \Delta G_{sws}^{LW} + \Delta G_{sws}^{AB}, \quad (6)$$

em que,

$$\Delta G_{sws}^{LW} = -2 \times \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_W^{LW}} \right)^2, \quad (7)$$

$$\Delta G_{sws}^{AB} = -4 \times \left[\left(\sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_S^-} + \sqrt{\gamma_W^+ \times \gamma_W^-} - \sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_W^-} - \sqrt{\gamma_W^+ \times \gamma_S^-} \right) \right]. \quad (8)$$

Pela resolução das equações acima, a partir dos valores das componentes de tensão superficial, obtém-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.

3.6.5 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 (ΔG_{adesao}^{TOT}), que pode ser expressa pela equação:

$$\Delta G_{adesao}^{TOT} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_{1W}^{LW} - \gamma_{2W}^{LW} + 2 \times \left[\sqrt{\gamma_W^+} \left(\sqrt{\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_W^-} \right) + \sqrt{\gamma_W^-} \left(\sqrt{\gamma_1^+} + \sqrt{\gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_W^+} \right) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} \right]. \quad (9)$$

em que:

$$\gamma_{12}^{LW} = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2 \times \sqrt{\gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW}} \quad (10)$$

Nas equações acima, 1 corresponde a superfície de adesão, 2 representa a bactéria e w refere-se a água.

Pela aplicação das equações 9 e 10 obtém-se o valor da energia livre total de adesão que permite fazer uma avaliação termodinâmica do fenômeno de adesão. Segundo a teoria termodinâmica a adesão será favorável se a interação conduzir a uma diminuição da energia livre global. Se ($\Delta G_{adesao}^{TOT} < 0$) a adesão é favorecida, caso contrário, é termodinamicamente desfavorável.

3.7 Delineamento Experimental

Para as análises de identificação da microbiota natural e do grau de adesão da *Salmonella* Enteritidis, o experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x2), com três repetições. As fontes de variação utilizadas foram: formas de cultivo da alface (convencional e hidropônico) e o processo de sanitização (sanitizado e sem sanitizar). Cada repetição foi constituída de alfaces, dos dois cultivos, obtidos em datas diferentes.

Na determinação dos ângulos de contatos e avaliação da hidrofobicidade o experimento seguiu o mesmo delineamento experimental, porém no esquema fatorial 2x2x3 (formas de cultivo da alface, sanitização e reagentes utilizados para determinação do ângulo de contato).

O experimento para análise de rugosidade foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, em três repetições e dois tratamentos (alfaces hidropônico e convencional).

Todos os dados obtidos no experimento foram interpretados por meio de análise de variância e, as médias dos fatores, comparadas utilizando-se o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram analisados através do programa estatístico SAS, versão 9.1 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.1 Avaliação da presença de *Salmonella* sp. em alface de cultivo hidropônico e convencional

Para determinar a presença de *Salmonella* sp. em alface convencional e hidropônica, foram coletadas amostras de alface convencional e hidropônica de diferentes regiões de cultivo, sendo as amostras analisadas por métodos de cultivo e métodos de detecção por PCR. Os resultados foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados da presença de *Salmonella* sp. em alface convencional e hidropônica foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

4.2 Avaliação da Microbiota Natural de Alface de Cultivo Hidropônico e Convencional

Os resultados da presença de *Salmonella* sp. em alface convencional e hidropônica foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados por meio de teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

4 Resultados e Discussões

4.1 Avaliação da presença de *Salmonella* sp. em alface de cultivo hidropônico e convencional

Não foi constatada a presença de *Salmonella* sp. em alfaces provenientes de cultivo convencional e hidropônico. O resultado indica que as amostras analisadas estão de acordo com a Resolução da ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece para hortaliças *in natura* a ausência de *Salmonella* em 25 g, visando a preservação da saúde pública. Souza et al. (2006), avaliando a qualidade higiênico-sanitária de alfaces produzidas pelas formas de cultivo convencional e hidropônico, em Rio Branco-AC, também não encontraram *Salmonella* sp. em nenhuma das amostras.

Entretanto a presença de microrganismos patogênicos como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em vegetais crus, incluindo alface, têm sido identificada por vários pesquisadores (TAKEUCHI et al., 2000). Durante abril de 2007, dois grandes recolhimentos de alface minimamente processada ocorreram no Reino Unido após a detecção de *Salmonella* (HEATON e JONES, 2007).

4.2 Avaliação da Microbiota Natural de Alface de Cultivo Hidropônico e Convencional

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que a contagem total de aeróbios mesófilos foi maior ($P < 0,05$) na alface de cultivo convencional, verificando-se uma diferença de aproximadamente 2,7 ciclos logarítmicos. Resultados semelhantes foram observados por Favaro-Trindade et al. (2007), ao analisarem a contagem de aeróbios mesófilos em alfaces de cultivo hidropônico, convencional e orgânico. Esses autores verificaram que a média das contagens de aeróbios mesófilos

na alface hidropônica foi inferior a 2 ciclos logarítmicos em comparação às médias obtidas para as alfaces provenientes dos cultivos orgânico e convencional.

Tabela 2: Médias dos logaritmos da contagem ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) da microbiota presente em alface de cultivo convencional e hidropônico.

Microbiota	Hidropônico *	Convencional *	Diferença
Contagem Total de aeróbios mesófilos	2,16 ^b ± 1,07	4,93 ^a ± 1,11	2,77
Fungos filamentosos e Leveduras	2,76 ^a ± 0,57	2,90 ^a ± 0,95	0,14
Bactérias Lácticas	1,61 ^b ± 0,68	2,86 ^a ± 1,09	1,25
Coliformes a 35 °C	0,95 ^b ± 0,79	2,39 ^a ± 0,59	1,44
<i>Escherichia coli</i>	-	0,24 ± 0,60	0,24

- Não detectada em 0,1 g da amostra

*Médias ± desvio padrão

^{a-b}Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan

A legislação não prevê limites para a contagem total de aeróbios mesófilos para hortaliças frescas *in natura*. As contagens totais de bactérias em hortaliças não indicam se a população tem efeito benéfico ou prejudicial. Contudo, servem como um alerta das condições de higiene durante a produção, como também dos potenciais riscos oferecidos à saúde do consumidor (BRASIL, 2001; BRASIL, 1997;).

A Resolução nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 02 de janeiro de 2001 não determina limites ou índice máximo em hortaliças para coliformes a 35°C, porém a presença destes microrganismos pode indicar condições higiênicas insatisfatórias. Foi verificada a presença desses microrganismos nas alfaces oriundas dos dois tipos de cultivo, sendo que a alface de cultivo convencional apresentou maior contagem (2,39 $\log \text{UFC.g}^{-1}$). Somente na alface convencional foi observada a presença de *E. coli*, o que sugere condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na contagem de fungos filamentosos e leveduras entre os tipos de alface, obtendo-se valores entre 2,76 e 2,9 $\log \text{UFC.g}^{-1}$. Para bactérias lácticas, os tipos de alface diferiram ($P < 0,05$), constatando-se uma maior contagem desse grupo de microrganismos na alface de cultivo convencional.

Os resultados das contagens da microbiota apresentados na Tabela 3, mostram que houve diferença ($P < 0,05$) no número de microrganismos das amostras de alface sanitizadas e sem sanitizar, para todos os grupos de microrganismos anali-

sados.

Tabela 3: Valores das médias da contagem de microrganismos, em log UFC.g⁻¹, em alface sanitizada e sem sanitizar.

Microbiota	Sem Sanitizar *	Sanitizada *	Diferença
Contagem de aeróbios mesófilos	4,44 ^a ± 1,55	2,65 ^b ± 1,62	1,80
Fungos filamentosos e Leveduras	3,48 ^a ± 0,23	2,18 ^b ± 0,44	1,30
Bactérias Lácticas	3,01 ^a ± 0,93	1,47 ^b ± 0,56	1,54
Coliformes a 35 ° C	2,24 ^a ± 0,75	1,10 ^b ± 0,93	1,14
<i>Escherichia coli</i>	0,24 ± 0,60	-	0,24

- Não detectada em 0,1 g da amostra

*Médias ± desvio padrão

^{a-b}Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

A alface submetida a sanitização com clorado orgânico apresentou reduções das contagens microbianas variando entre 1,14 a aproximadamente 2 ciclos logarítmicos, independente do tipo de cultivo. A contagem total de aeróbios mesófilos foi reduzida em 1,8 ciclos logarítmicos após a sanitização. Esse resultado corrobora com os encontrados por Beuchat et al (1998) que submeteram alface a uma concentração de 200 mg.L⁻¹ de CRT por 10 min com posterior enxágüe em água, e verificaram uma redução de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos nesse grupo microbiano.

Em relação as bactérias lácticas, a contagem diminuiu de 3,0 log UFC.g⁻¹ para 1,47 log UFC.g⁻¹, representando uma redução de 1,5 ciclos log, enquanto que a contagem de fungos e leveduras indicou um decréscimo de 1,3 ciclos log.

4.3 Determinação do número de células de *S. Enteritidis* nas folhas de alface e influência da microbiota natural na adesão

O número de *S. Enteritidis* diferiu ($P < 0,05$) em razão do tipo de cultivo, verificando-se maiores níveis de adesão na alface oriunda do sistema de cultivo hidropônico (Tabela 4).

Tabela 4: Médias dos logaritmos do número de células aderidas de *S. Enteritidis* em alface de cultivo hidropônico e convencional.

Tipo de Alface	* log UFC.cm ⁻²
Hidropônico	5,2 ^a ± 0,56
Convencional	4,6 ^b ± 0,28

*Médias ± desvio padrão

^{a-b}Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

A adesão do patógeno foi diferente ($P < 0,05$) entre as amostras sanitizadas ou não. Um maior número de células aderidas foi observado nas amostras submetidas a cloração (Tabela 5). O logaritmo do número de células aderidas foi de 5,2 para a amostra sanitizada e de 4,7 para a amostra sem sanitizar. A adesão bacteriana, expressa em logaritmo do número de UFC.cm⁻², em função da submissão ao processo de sanitização, está representada na Tabela 5.

Tabela 5: Médias dos logaritmos do número de células aderidas de *S. Enteritidis* em alface, sanitizada e sem sanitizar.

Sanitização	* log UFC.cm ⁻²
Com Sanitização	5,2 ^a ± 0,64
Sem Sanitização	4,7 ^b ± 0,24

*Médias ± desvio padrão

^{a-b}Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se afirmar que houve influência da microbiota natural na adesão de *S. Enteritidis* nas alfaces. Foi observado um menor número de células aderidas na alface de cultivo convencional, cuja microbiota natural encontrada nesse experimento foi maior do que a microbiota da alface de cultivo hidropônico. Isso sugere que a microbiota nativa pode ter propriedades inibitórias contra a adesão de patógenos. Tal fato se confirma, quando se avalia a adesão nas amostras de alface submetidas ou não ao processo de sanitização, pois naquelas sanitizadas o número de células do patógeno foi maior, em vista do processo ter reduzido cerca de 1 a 2 ciclos log da microbiota inicial. Os resultados sugerem uma alteração na composição da microbiota das superfícies das alfaces, no entanto, aparentemente a redução do número de microrganismos foi o principal fator que influenciou no processo de adesão do patógeno.

Vários trabalhos têm mostrado a importância da microbiota natural no controle de patógenos em vegetais (WEI et al., 2006; PARISH et al., 2003; LIAO e FETTI, 2001; CARLIN et al., 1996; VESCOLO et al., 1996). A competição com

patógenos por espaço físico e nutrientes e/ou produção de compostos antagônicos que afetam negativamente a viabilidade de patógenos foi observada em pesquisas realizadas por Liao e Fetti (2001) e Parish e colaboradores (2003).

Estudos realizados por Babic et al. (1997), demonstraram que a microbiota natural em espinafre inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes*. Wei et al. (2006) observaram que a presença de *Pseudomonas* reduziu o número de *S. Typhimurium* em alface refrigerada, devido a ação antagonista de *Pseudomonas*. Também o efeito antagonista entre bactérias lácticas isoladas de saladas contra o crescimento de *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *S. aureus* foi constatado por Vescoso e colaboradores (1996). Uma mistura de grupos de microrganismos isolados das folhas de chicória inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* inoculadas nas folhas desse vegetal (CARLIN et al., 1996).

De acordo com Wei et al. (2006), a capacidade de ligações específicas de organismos protetores em alface é uma propriedade desejável, para uma competição bem sucedida por sítios de ligação e fornecer aos organismos uma vantagem competitiva adequada.

Tais resultados mostram que bactérias naturalmente presentes em vegetais, podem competir com microrganismos patogênicos, e influenciar no processo de adesão nas suas superfícies. Nesse sentido, a aplicação de microrganismos, como por exemplo, bactérias lácticas, para prevenir o crescimento de patógenos em produtos frescos prontos para o consumo está sendo muito estudada. No entanto, o controle biológico deve ser considerado como uma alternativa adicional das boas práticas de produção e dos cuidados higiênico-sanitários. Além disso, a recontaminação de produtos sanitizados deve ser extensivamente controlada e evitada.

4.4 Avaliação da adesão e caracterização topográfica das superfícies por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na observação visual das fotomicrografias constataram-se diferenças entre as superfícies foliares das alfaces provenientes do cultivo hidropônico e convencional (Figuras 6 e 7), o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão obtidos nesse experimento. As células da alface hidropônica apresentaram-se mais alongadas.



Figura 6: Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo hidropônico observada por MEV.

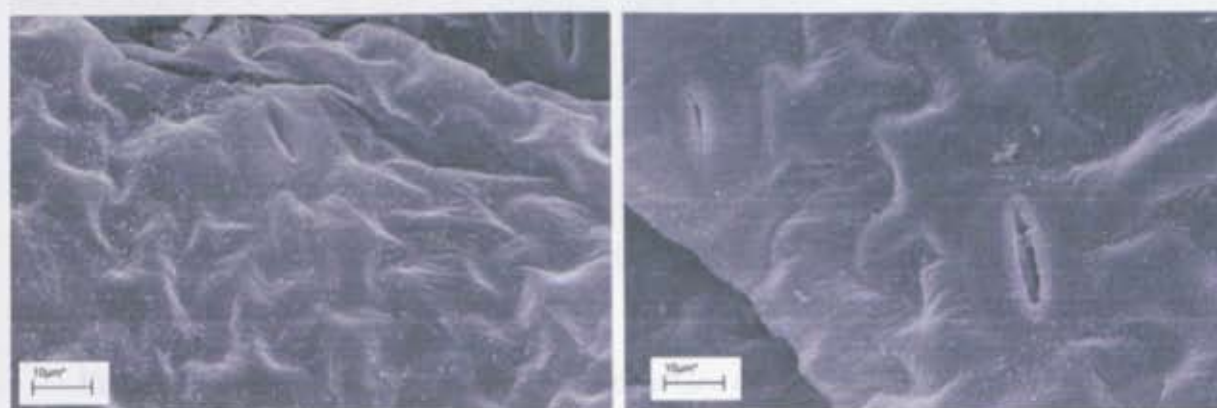


Figura 7: Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo convencional observada por MEV.

A adesão de bactérias em uma superfície depende de vários parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e inerentes ao material. Especialmente a topografia da superfície tem sido amplamente discutida como um parâmetro de influência na adesão bacteriana (HILBERT et al, 2003).

As fotomicrografias mostraram que a superfície foliar é irregular, constituída de estômatos, nervuras, fendas e protuberâncias. Quirynen e Bollen (1995) afirmam que as irregularidades da superfície contribuem para um aumento da área superficial disponível para a adesão.

Portanto, características inerentes à morfologia de cada uma das superfícies estudadas podem ter influenciado nos diferentes níveis de adesão de *S. Enteritidis* encontrados nas amostras de alface.

Por meio da MEV foi possível verificar também, a interação das células microbianas aderidas nas superfícies foliares. Nas figuras 8 e 9, respectivamente, estão apresentadas as fotomicrografias das superfícies de alface hidropônico e convencional com células aderidas de *S. Enteritidis*.

As imagens permitem observar bacilos com cerca de $1,5 \mu\text{m}$ de comprimento aderidos as superfícies, os quais correspondem as células de *S. Enteritidis*. Além disso, a microscopia revelou que os estômatos serviram de entrada e abrigo para as células do patógeno.

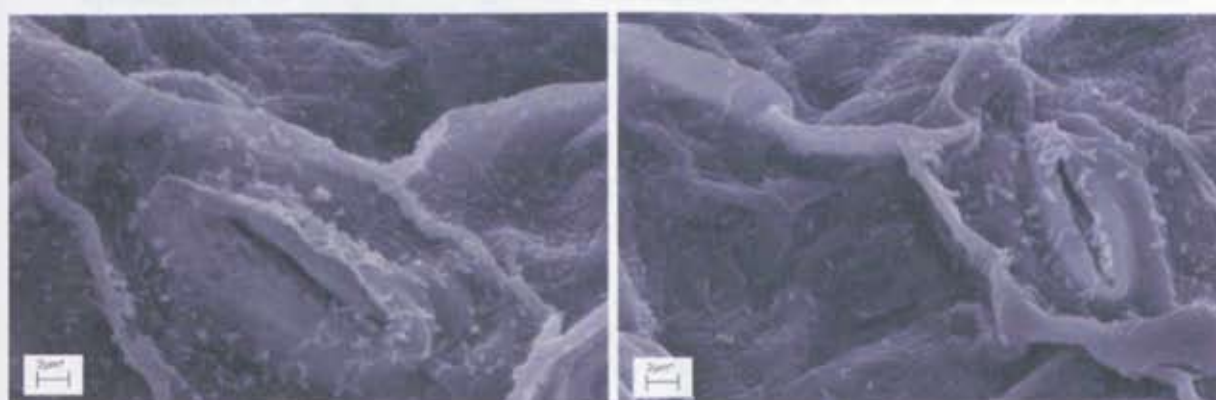


Figura 8: Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo hidropônico com células de *S. Enteritidis* observada por MEV.

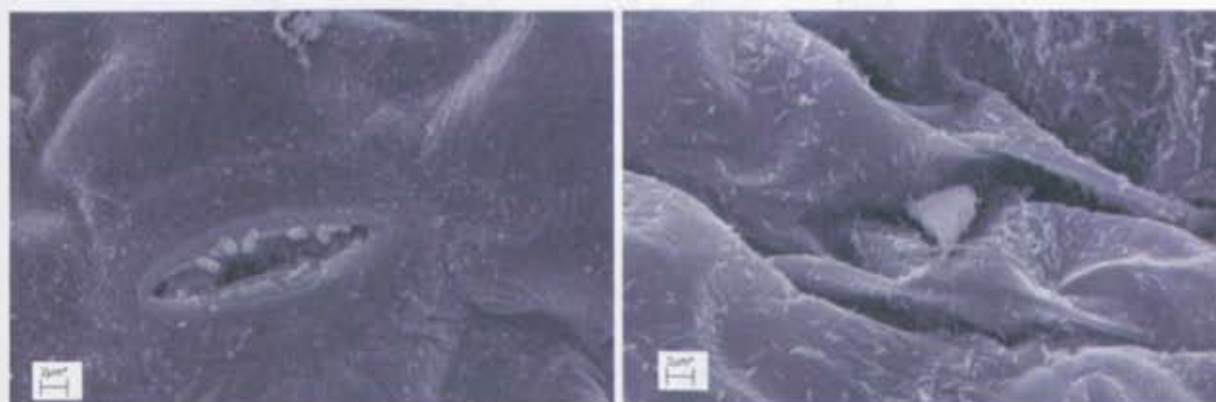


Figura 9: Fotomicrografias da superfície de alface de cultivo convencional com células de *S. Enteritidis* observada por MEV.

A infiltração dos microrganismos em fissuras e espaços intercelulares em frutas e vegetais tem sido demonstrada (BEUCHAT, 2002).

4.5 Avaliação da influência da topografia das superfícies na adesão por Microscopia de Força Atômica (MFA)

Diferenças entre as duas superfícies avaliadas foram também observadas nas fotomicrografias da Microscopia de Força Atômica. Nas figuras 10 e 11 estão apresentadas as imagens topográficas das superfícies das alfaces oriundas dos dois sistemas de cultivo, hidropônico e convencional, respectivamente, em planos tridimensional e bidimensional.

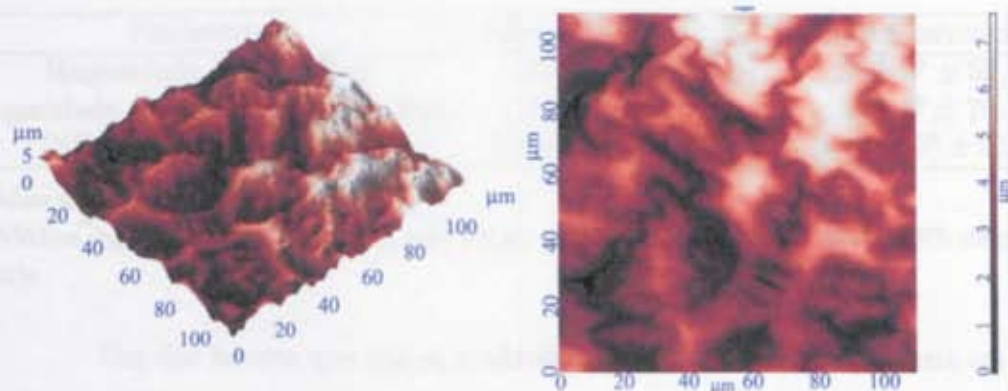


Figura 10: Microtopografia da superfície de alface de cultivo hidropônico, em planos tridimensional e bidimensional realizada por MFA.

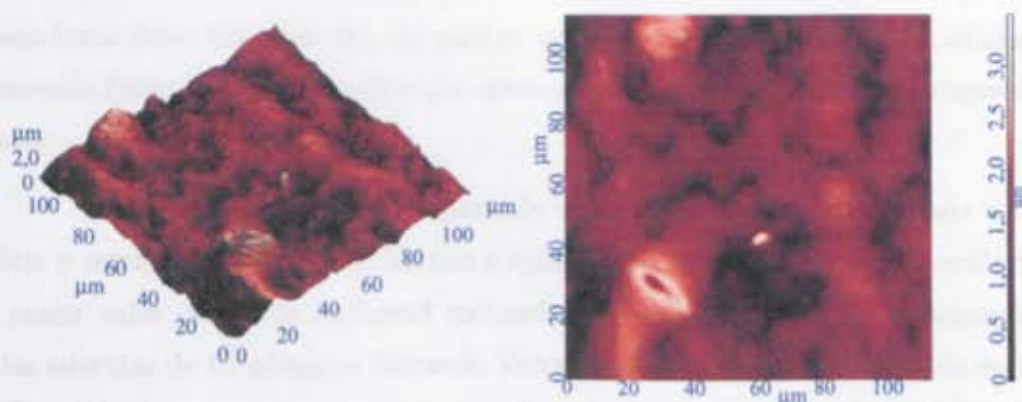


Figura 11: Microtopografia da superfície de alface de cultivo convencional, em planos tridimensional e bidimensional realizada por MFA.

De acordo com os dados de rugosidade apresentados na Tabela 6, pôde-se confirmar que há diferença ($P < 0,05$) entre as duas superfícies foliares. Os resultados mostraram que a alface oriunda do sistema de cultivo hidropônico possui superfície mais rugosa. A rugosidade média (Ra) encontrada da superfície da alface hidropônica foi de 1.211,2 nm, e para a alface convencional o valor médio desse parâmetro foi de 293,3 nm. O valor de Ry, que representa a diferença de altura entre o pico mais alto e o vale mais profundo da superfície, também foi diferente ($P < 0,05$) para as duas superfícies avaliadas, confirmando a maior rugosidade da alface proveniente de cultivo hidropônico.

Tabela 6: Parâmetros de rugosidade das superfícies de alface concencional e hidropônico medidos por Microscopia de Força Atômica.

Parâmetros	Alface Hidropônico *	Alface Convencional *
Rugosidade Média (Ra)	1.211,2 ^a ± 171,15	293,3 ^b ± 59,56
Rugosidade Quadrática Média (Rq)	1.467,5 ^a ± 237,74	381,8 ^b ± 76,33
Diferença de altura (Ry)	7.100,74 ^a ± 660,12	3.095,40 ^b ± 316,47

* Médias (nm) ± desvio padrão

^{a-b} Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

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 Ra da superfície provocará um aumento da retenção microbiana nessa superfície. Tal fato foi constatado na determinação de células aderidas nas superfícies de alface hidropônico e convencional desse experimento, no qual se verificou um maior número de células de *Salmonella* Enteritidis na superfície da alface de cultivo hidropônico, cuja rugosidade é maior.

Muitos trabalhos têm reportado uma relação entre rugosidade da superfície e retenção microbiana. Verran e colaboradores (2001) também verificaram que 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 microorganismo/material proporciona mais pontos de contato, facilitando assim que a adesão irreversível se estabeleça.

4.6 Influência da Hidrofobicidade na adesão

O ângulo de contato com a água fornece uma informação qualitativa sobre a hidrofobicidade da superfície (OLIVEIRA, 2006). A amostra é considerada hidrofóbica se o ângulo é maior que 65° , e hidrofílica quando menor ou igual a 65° (VOGLER, 1998). De acordo com esse critério, pode-se dizer que as superfícies de *S. Enteritidis* e da alface convencional são hidrofílicas, enquanto a alface de cultivo hidropônico é hidrofóbica (Tabela 7). Entretanto, alguns autores consideram uma superfície hidrofóbica quando o ângulo de contato com a água é superior a 50° (ADAMSON, 1982).

Tabela 7: Valores médios dos ângulos de contato (θ) determinados à temperatura ambiente sobre as superfícies de adesão e de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, com água (θ_W), formamida (θ_F) e α -bromonaftaleno (θ_B).

Superfícies Avaliadas	θ_W *	θ_F *	θ_B *
Alface Hidropônico	$74,15^{a,c} \pm 8,73$	$70,02^{a,c} \pm 5,07$	$35,62^{b,d} \pm 7,38$
Alface Convencional	$57,50^{b,c} \pm 7,60$	$50,97^{b,c} \pm 1,94$	$45,85^{a,d} \pm 2,16$
<i>Salmonella</i> Enteritidis	$17,75^d \pm 2,61$	$15,15^d \pm 0,49$	$69,30^c \pm 0,70$

* Médias \pm desvio padrão

^{a-b} Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si ($P > 0,05$), pelo teste de Duncan

^{c-d} Médias seguidas pela mesma letra, em cada linha, não diferem entre si ($P > 0,05$), pelo teste de Duncan

Oliveira et al. (2006) encontraram para cinco estirpes de *S. Enteritidis* valores de ângulo de contato com a água entre $9,7$ e 14° , classificando-as como hidrofílicas. Esse resultado estar em conformidade com o encontrado nesse experimento, em que apesar do ângulo de contato formado entre *Salmonella* Enteritidis e a água ter sido levemente superior aos verificados por esse autores ($17,75^\circ$), tal valor também indica que esse patógeno é hidrofílico.

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 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, os valores de energia livre de superfície indicaram que a alface proveniente de sistema hidropônico é hidrofóbica ($\Delta G_{\text{ads}} <$

0), enquanto que a superfície da alface de cultivo convencional é levemente hidrofílica ($\Delta G_{sws} = 0,65$). Em se tratando do microrganismo, pode-se dizer que este, possui superfície hidrofílica ($\Delta G_{sws} > 0$), reforçando o valor do ângulo de contato obtido da superfície com a água (Tabela 8).

Tabela 8: Valores das componentes de tensão superficial (γ^{LW}, γ^+ e γ^-) e grau de hidrofobicidade (ΔG_{sws}) das superfícies de adesão e de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

Superfícies	$\gamma^{LW} *$	$\gamma^+ *$	$\gamma^- *$	$\Delta G_{sws} *$
Alface Hidropônico	36,48	0	19,99	-15,43
Alface Convecional	31,94	0,43	27,01	0,65
<i>Salmonella</i> Enteritidis	20,33	8,41	49,06	16,75

* Valores expressos em mJ.m^{-2}

É sabido que, em solução aquosa, a adesão é favorável 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).

Sinde e Carbalho (2000) avaliaram a adesão de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em aço inoxidável, borracha e politetrafluoretileno, e reportaram que tais microrganismos, classificados como hidrofílicos, apresentaram maior adesão nas superfícies mais hidrofóbicas, concluindo que, nesse estudo a adesão não pode ser correlacionada com a hidrofobicidade das superfícies, medidas pela energia livre e ângulos de contato de superfície. Esses resultados são similares àqueles obtidos nesse experimento. *S. Enteritidis*, cuja superfície classificada como hidrofílica aderiu cerca de 4 vezes mais na alface hidropônica definida como hidrofóbica. Porém, vale ressaltar, que existem outros fatores, além da hidrofobicidade das superfícies, que estão relacionados com a adesão, mas que não são contabilizados na avaliação termodinâmica. Neste caso, a rugosidade da superfície e microbiota competidora foram os principais fatores envolvidos na adesão do patógeno às superfícies foliares.

4.7 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 adesão de *S. Enteritidis* às superfícies foliares, permitiu verificar que, a adesão é termodinamicamente desfavorável ($\Delta G_{adesao} > 0$) para os dois tipos de alface, independente da forma de cultivo.

Na Tabela 9 encontram-se os valores da energia livre total de adesão (ΔG_{adesao}), que permite fazer uma previsão teórica da adesão de *Salmonella* Enteritidis às superfícies de adesão, alfaces de cultivo hidropônico e convencional.

Tabela 9: Valores da energia livre total de adesão entre *S. Enteritidis* ATCC 13076 (1) e a superfície de adesão (2), ΔG_{adesao}^{TOT} em mJ.m^{-2} .

Interação	γ_{12}^{LW} *	ΔG_{adesao}^{TOT} *
<i>Salmonella</i> Enteritidis e Alface Hidropônico	2,34	17,70
<i>Salmonella</i> Enteritidis e Alface Convencional	1,30	17,57

* Valores expressos em mJ.m^{-2}

Os resultados da avaliação termodinâmica explicam o baixo percentual de bactérias aderidas às superfícies foliares. Para cada 1.000 células do patógeno em suspensão apenas 6,4 células e 1,6 células aderiram às superfícies das alfaces provenientes do cultivo hidropônico e convencional, respectivamente.

5 Conclusões

A adesão de *S. Enteritidis* foi influenciada pela microbiota natural das alfaces de cultivo hidropônico e convencional. Ocorreu maior adesão na alface de cultivo hidropônico, cujo número de microrganismos naturalmente presentes foi menor. Também, *S. Enteritidis* aderiu mais nas alfaces previamente sanitizadas com um composto clorado orgânico utilizado para redução do número de microrganismos, tanto na alface de cultivo hidropônico quanto na de cultivo convencional.

A superfície da alface de cultivo hidropônico foi mais rugosa como observado pela MFA, o que parece ter contribuído também para uma maior adesão do patógeno.

A superfície da alface hidropônica apresentou característica hidrofóbica enquanto a de cultivo convencional, levemente hidrofílica, de acordo com as medições qualitativas dos ângulos de contato com a água e com os cálculos de energia livre de superfície. A superfície de *S. Enteritidis* foi classificada como hidrofílica pela mesma técnica. *S. Enteritidis* aderiu cerca de 4 vezes mais na alface hidropônica, sugerindo que não houve uma relação da hidrofobicidade das superfícies no maior número de bactérias aderidas. No entanto, devem-se considerar outros fatores, como rugosidade e microbiota competidora, como os principais responsáveis pela adesão.

A avaliação termodinâmica por meio da quantificação da energia livre total de interação indicou que a adesão de *S. Enteritidis* às superfícies de alface é termodinamicamente desfavorável ($\Delta G_{adesao} > 0$). Dessa forma, os resultados das análises termodinâmicas explicam a baixa capacidade de adesão do patógeno às superfícies foliares.

Parece promissor encontrar organismos entre a microbiota natural que sejam responsáveis por expor características patógeno-inibitórias, e, via competição ou antibioses, funcionar como obstáculo para adesão e crescimento de patógenos.

Nesse sentido, maiores informações a respeito dos fatores envolvidos no

mecanismo de adesão bacteriana em superfícies de alimentos são de grande importância para o controle do crescimento e da sobrevivência de patógenos. Tais conhecimentos podem contribuir para a adoção de estratégias de intervenção que possam afetar a interação entre microrganismos e superfícies de alimentos, impedindo dessa forma, que o processo de adesão se estabeleça.

- ALLENBERG, H. P., LANDGREN, E. S., PROBERT, J. E., DINEY, W. A. & DILL, C. A., STAMMANN, A. W. Bacterial contamination of commercial salmon. *Applied and Environmental Microbiology*, **1**, 193-197, 1963.
- ALLENBERG, A. W. *Physical chemistry of surfaces*. New York: Wiley Interscience, 1952.
- BALCH, L., STANDA, A. & BROWN, J. M. Survival of *Escherichia coli* against exposure by passive adsorption to surfaces and other properties of fresh-cut spinach. *Journal of Food Protection*, **35**, 2, 93-97, 1972.
- BALFOUR, J. K. *Patologia bacteriana humana e patologia bacteriana dos animais domésticos* (1974). 2a edição. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1974. 1000 pp.
- BALFOUR, J. K. & LAWRENCE, J. W. (1971). The survival of bacteria on fresh-cut lettuce. *Journal of Food Protection*, **34**, 2, 198-200.
- BAXTER, W. E., ROYCE, A. E. The microbacteriological stability of fresh-cut lettuce and Green-pasture lettuce as determined by analysis. *Journal of General Microbiology*, **1**, 126-130, 1947.
- BRECKENRIDGE, L. H. Pathogenic vibrios isolated associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, **35**, 12, 228-231, 1972.
- BRIDGES, J. B. Ecological factors influencing survival and growth of bacterial pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, **3**, 1, 2, 1-4, 1971.
- BROOKHUIS, L. P., NAB, B. V., ALLEN, J. P., CLAVETT, M. J. Efficacy of some disinfectants of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on the surface of tomatoes and lettuce. *Journal of Food Protection*, **35**, 12, 232-235, 1972.
- BROCKBUSH, R. E., SPALTINGER, G. L. Fruits and vegetables as sources of contamination of produce. In *Contamination of produce for the microbacteriological evaluation of fresh food*. Washington: AFMA, p. 213-242, 1971.
- CRADOCK-WATSON, M. C., DUMBLE, W. A. Antagonistic action of *Escherichia coli* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **28**, 1-27. *Effect of drying growth and antibiotic tolerance*. *Journal of Food Protection*, **3**, 12, 133-136, 1972.

Bibliografia

- ABSOLOM, D. R., LAMBERTI, F. V., POLICOVA, Z., ZINGG, W., VAN OSS, C. J., NEUMANN, A. W. **Surface thermodynamics of bacterial adhesion.** Applied and Environmental Microbiology, v. 46:90-97, 1983.
- ADAMSON, A. W. **Physical chemistry of surfaces.** New York: Wiley-Interscience, 1982.
- BABIC, I.; WATADA, A. E.; BUTA, J. G. **Growth of *Listeria monocytogenes* restricted by native microorganisms and other properties of fresh-cut spinach.** Journal of Food Protection, v. 60, p. 912-917, 1997.
- BAPTISTA, F.R. ***Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.): avaliação patogênica e controle biológico.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.
- BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M. **Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks.** Science, v. 287, p. 50-61, 2000.
- 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.
- BEUCHAT, L.R. **Pathogenic microorganisms associated with fresh produce.** Journal of Food Protection, v.59, n.2, p.204-216, 1995.
- BEUCHAT, L. R. **Ecological factor influencing survival and growth of humans pathogens on raw fruits and vegetables.** Microbes and Infections, v. 4, p. 413-423, 2002.
- BEUCHAT, L.R.; NAIL, B.V.; ADLER, B.B.; CLAVEIRO, M.R.S. **Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce.** Journal of Food Protection, Ames, v.61, n.10, p.1305-1311, 1998.
- BRACKETT, R.E.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Fruits and vegetables.** In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: APHA, p.515-520, 2001.
- BRASHEARS, M. M.; DURRE, W. A. **Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O 157 : H7 during growth and refrigerated storage.** Journal of Food Protection, v.62, p.1336-1340, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. **Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001**. Dispõe sobre regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm>>. Acesso em: 11 mai. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997**. Dispõe sobre regulamento técnico sobre princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em:<<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 11 mai. 2008.

BUSSCHER, H.J; WEERKAMP, A.H. *Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata*. FEMS Microbiology Reviews, v. 46, p. 165-173, 1987.

BUSSCHER, H. J. A. H.; WEERKAMP, H. C.; VAN DER MEI, A. W. J.; VAN PELT, H. P. de Jong.; J. ARENDS. **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.

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. and Rosenberg, M. (Eds). *Microbial cell surface hydrophobicity*. American Society of Microbiology, Washington, D. C, 1990.

CAMPO, J. D.; CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C. **Effects of epiphytic Enterobacteriaceae and Pseudomonads on the growth of *Listeria monocytogenes* in model media**. Journal of Food Protection, v.64, p.721-724, 2001.

CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C.; MORRIS, C.E. **Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Chichorium endiva* var. *latifolia*)**. Journal of Food Protection, v.59, p.698-703, 1996.

CASTRO, F.A.; SANTOS, V.R.; MARTINS, C.H.G.; FERNANDES, S.A.; ZAIA, J.E.; MARTINEZ, R. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999**. The Brazilian Journal of Infections Diseases, v. 6, n. 5, p. 244- 251, 2002.

CHAVES, L. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável**. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da 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.

- COSTA, E.T.R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável.** Seropédica, Dissertação (Mestrado em microbiologia veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.
- DAHLBACK, B.; HERMANSSON, M.; KJELLERBERG, S.; NORKANS, B. **The hydrophobicity of bacteria-an important factor their initial adhesion at the air-water interface.** Archives of Microbiology, vol.128, p. 267-270, 1981.
- 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.
- DENYER, S. P.; GORMAN, S. P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control.** Blackwell Scientific Publications, p.333, 1993.
- DIAS, R.S.; CARMO, L.S.; SILVA, M.C.C. **Surto de toxinfecção alimentar causado pela ação simultânea de enterotoxina estafilocócica e *Salmonella* Enteritidis.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 58, n. 1, p. 7-11, 1999.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods to the microbiological examination of foods.** 4ª ed. APHA, 676p., 2001.
- 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, 1995.
- ESPER, M.R.N.R.; FREITAS, A.M.; FERNANDES, S.A.; NEME, S.N.; TAVECHIO, A.T.; ROMÃO, M.M.; CAFÉ, M.L. ***Salmonella*: sorovares identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 57, n. 2, p. 45-50, 1998.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; MARTELLO, L.S.; MARCATTI, B.; MORETTI, T.S.; PETRUS, R.R.; ALMEIDA, E.; FERRZ, J.B.S. **Efeito dos Sistemas de Cultivo Orgânico, Hidropônico e Convencional na Qualidade de Alface Lisa.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 10, n. 2, p. 111-115, abr./jun. 2007.
- FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. **Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes.** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2002.
- FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. **Atomic Force Microscopy applied to immunoassays.** Química Nova, v.29, 2006.
- FILGUEIRA, F.A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV, p. 40 - 135, 288 - 295, 2000.

- FOWKES, F. M.; MCCARTH, W. A.; MOSTAFA, M. A. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.78, 2000. Referido por van Oss (1994), 1980.
- FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. **Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 biofilms.** *Molecular Microbiology*, v.51, p.675-690, 2004.
- FURLANI, P. R. **Hidroponia.** Instituto Agronômico de Campinas, Boletim Técnico, v. 100, 1996.
- GADELHA, R. S. S.; CELESTINO, R.C.A.; SHIMOYA, A. **Efeito da utilização de urina de vaca na produção da alface.** *Pesquisa Agropecuária e Desenvolvimento Sustentável*, v. 1, p.179-182, 2003.
- GAWANDE, P.V.; BHAGWAT, A.A. **Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. during acid challenge: a model study using polyethersulfone membranes.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.86-92, 2002.
- GIBBONS, R. J.; ETHERDEN, I. **Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles.** *Infection and Immunity*, v.41, n.3, p.1190-6, 1983.
- 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.
- GUADAGNIN, S. G.; RATH, S.; REYES, F. G. R. **Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems.** *Food Additives and Contaminants*, London, v. 22, n. 12, p.1203-1208, 2005.
- HAMERSCHMIDT, I. **Agricultura orgânica: conceituações e princípios.** In: *Anais do 38º Congresso Brasileiro de Olericultura*, Petrolina (PE): ART MÍDIA, 1998. cd-rom.
- 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.3140-6, 2000.
- HEATON, J.C.; JONES, K. **Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review.** *Journal of Applied Microbiology*, p.1-14, 2007.
- HERRMANN, P.S.P.; SILVA, M.A.P.; BERNARDES, R.; JOB, A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. **Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros.** *Polímeros*, p.51-61, 1997.

HILBERT, L. R.; BAGGE-RAVN, D.; KOLD, J.; GRAM, L. **Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance.** International Biodeterioration e Biodegradation, v. 52, p. 175 - 185, 2003.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R. E; SCHILLINGER, U. **Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes.** International Journal of Food Microbiology, v. 24, p. 343-362, 1995.

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. **Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp. ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994-1997.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 58, n.1, p. 47-51, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** Tradução Eduardo Cesar Tondo. Porto Alegre: Artmed, p. 543 a 582, 2005.

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.

KLAUSEN, M.; AES-JORGENSEN, A.; MOLIN, 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.

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.

LANDGRAF, M. **Fundamentos e perspectivas da irradiação de alimentos visando ao aumento de sua segurança e qualidade microbiológica.** Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LAUKOVA, A.; JURIS, P.; VASILKOVA, Z.; PAPAJOVA, I. **Treatment of sanitary-important bacteria by bacteriocin substance V 24 in cattle dung water.** Letters in Applied Microbiology, v. 30, p.402-405, 2000.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S. ; JANISIEWICZ, W.; ABADIAS, M.; KURTZMAN, C.P.; CAMP, M.J. **Biocontrol of the Food-Borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on Fresh-Cut Apples with Naturally Occurring Bacterial and Yeast Antagonists.** Applied and Environmental Microbiology, p. 1135-1140, 2006.

LIAO, C.H. **Influence of soft rot bacteria on growth of *Listeria monocytogenes* on potato tuber slices.** Journal of Food Protection, v. 62, p.343-348, 1999.

LIAO, C. S.; FETT, W. F. **Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce.** Journal of Food Protection, v.64, p. 1110-1115, 2001.

MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura.** Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Disponível em: <http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/ME-Apostila.pdf.html> acesso em julho de 2008.

MARK, C.; VAN LOOSDRECHT, M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J. **The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion.** Applied and Environmental Microbiology, v. 53, p.1893-897, 1987.

MESQUITA, L.M.S.; LINS, F.A.F.; TOREM, M.L. **Biobeneficiamento mineral: Potencialidades dos microrganismos como reagentes de flotação.** Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 35p. Série Tecnologia Mineral, Vol. 81, 2002.

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

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

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology.** 7th ed. Washington, D.C: American Society of Microbiology, 1999.

NÓBREGA, M. F. F. **Perfil sócio-demográfico dos vendedores de hortaliças e prevalência de entoparasitas humanos em Lactuca sativa L. (alface).** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande- PB, 2002.

OLIVEIRA, K.M.P. **Adesão de Salmonella Enteritidis em diferentes superfícies de processamento de alimentos.** Londrina, P: UEL, 115p. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 2006.

OLIVEIRA, T. W. S.; SANTANA, L. R. R.; CARVALHO, R. D. S.; LEITE, C. C.; ALCÂNTARA, L. M. **Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (Lactuca sativa) comercializadas na cidade de Salvador-BA, segundo diferentes sistemas de cultivo.** Salvador: UFBA, 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.

PACHECO, M.A.S.R.; FONSECA, Y.S.K.; DIAS, H.G.G.; CÂNDIDO, V.L.P.; GOMES, A.H.S.; ARMELIN, I.M.; BERNARDES, R. **Condições higiênic-sanitárias de verduras e legumes comercializados no Ceagesp de Sorocaba- SP.** Higiene Alimentar, v. 16, p.50-55, 2002.

PAIVA, A.O. **Obtenção, caracterização e estudo in vitro do vidro bioativo VH30 e compósitos vidro bioativo/polihidroxibutirato.** Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Iajubá, 2005.

PARISH, M. E., BEUCHAT, L. R., SUSLOW, T. V., HARRIS, L. J., GARRETT, E. H., FARBE, J.N., et al. **Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh cut produce.** Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety, v. 2, 161-173 (supplement), 2003.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas** Viçosa, MG: UFV, Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

PATRICK, M.E.; ADOOCK, P.M.; GOMEZ, T.M.; ALTEKRUSE, S.F.; HOLLAND, B.H.; TAUXE, R.V.; SWERDLOW, D.L. **Salmonella Enteritidis infections in United States, 1985-1999.** Emerging Infections Diseases, v. 10, n.1, p. 1-7, 2004.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M; OLIVEIRA, R. **Influence of Físico-chemical Properties of Porous Microcarriers on the Adhesion of a Anaerobic Consortium.** Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology, v.24, p.181-186, 2000.

PIZZOLITTO, E.L. **Contribuição ao estudo in vitro da corrosão induzida por microrganismos sobre liga-metálica a base de cobre, de uso na Odontologia - modelo experimental com as cepas cariogênicas Streptococcus mutans e Streptococcus sobrinus.** Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M. **The Influence of Surface Roughness and Surface- Free Energy on Supra- and Subgingival Plaque Formation in Man.** Journal of Clinical Periodontology, v. 22, p. 1-14, 1995.

QUIRYNEN, M.; VAN DER MEI, H. C.; BOLLEN, C. M. L.; GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G. I.; BUSSCHER, H. J.; VAN STEENBERGHE, D. **Clinical Relevance of the Influence of Surface Free Energy and Roughness on the Supragingival and Subgingival Plaque Formation in Man.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.2, p.25-31, 1994.

REUTER, G. **Probiotics: possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for man and animals.** Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift, v.114, p.410-419, 2001.

RODRIGUES, L.R.F. Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, 762 p, 2002.

ROSA, O.O.; CARVALHO, E.P. Características microbiológicas de frutos e hortaliças minimamente processados. Boletim da SBCTA, v. 34, n. 2, p. 84- 92, 2000.

SANTANA, L. R. R.; CARVALHO, R. S. D.; LEITE, C.C.; AL-CANTRÂNTRA, 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, Campinas, v.26(2), p.264-269, 2006.

SCHUENZEL, M. K.; HARRISON, A. M. Microbial antagonists of food-borne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. Journal of Food Protection, v.65, p.1909-1915, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 2007. 295 p.

SILVA, J.O.; CAPUANO, D.M.; TAKAYANAGUI, O.M.; GIACOMETTI JÚNIOR, E. Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 8, n. 4, p. 385-392, 2005.

SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. São Paulo: USP, 1989. v.1, p. 71-79.

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.

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, 2342-2353, 2004.

SOUZA, M. L.; BEZERRA, D. C. F.; FURTADO, C. M. Avaliação higiênico-sanitária de alfaces (*Lactuca sativa* L) cultivadas pelos processos convencional e hidropônico e comercializadas em Rio Branco, AC. Higiene Alimentar, 20(145), 92-99, 2006.

SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. Postharvest Biology and Technology, v.33, p.141-151, 2004.

- SPADARO, D.; VOLA, R.; PIANO, S.; GULLINO, M. L. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, v.24, p.123-134, 2002.
- STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. *Res. Microbiol.*; v. 154, p. 329-335, 2003.
- TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. H. P.; BERGAMINI, A. M.; OKINO, M. H. T.; SILVA, A. M. C. C.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Riberão Preto, SP. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Riberão Preto*, v. 33, n.2, p.169-174, 2000.
- TAKEUCHI, K.; MATUTE, C.M.; HASSAN, A.N.; FRANK, J.F. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *Journal of Food Protection*, v.63, p.1433-1437, 2000.
- TEIXEIRA-YAÑEZ, L.D. Identificação, Patogenicidade e Sensibilidade a produtos químicos in vitro de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.). Dissertação de Mestrado, ESALQ, Piracicaba, SP, 74 p, 2000.
- TEIXEIRA, A. P. G. C. Caracterização Topográfica e Estrutural de filmes poliméricos provenientes de acetileno (C_2H_2) depositados a plasmas sobre substratos lisos e rugosos. Guaratinguetá, 2003. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2003.
- TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. *Journal of Science Technology*, v.25, p.807-815,2003.
- 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 and 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 LOOSDRECHT, M. C. M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, p.1898-1901, 1987.
- van OSS, C.J.; GIESE, R.F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays and Clay Minerals*, v. 43, p. 474-477, 1995.

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

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.

VERRAN, J.; MARYAN, C. J. **Retention of *Candida albicans* on Acrylic Resin and Silicone of Different Surface Topography.** *Journal of Prosthetic Dentistry*, v.77, p.535-539, 1997.

VIGGIANO, J. **Produção de sementes de alface.** In: CASTELLANE, P.D., NICOLOSI, W.M.; HASEGAWA, M. (Eds.). *Produção de sementes hortaliças.* Jaboticabal: FCAV/FUNEP, p.1-13, 1999.

VILLAS BÔAS, R. L.; PASSOS, J. C.; FERNANDES, D. M.; BÜLL, L. T.; CEZAR, V. R. S.; GOTO, R. **Efeitos de doses de compostos orgânicos na produção de alface em dois solos sob ambiente protegido.** *Horticultura Brasileira*, v. 22, p.28- 34, 2004.

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

ZOTTOLA, E. A. **Special techniques for studying microbial biofilms in food system.** In: Tortorello, M. L. e Gendel, S. M. *Food microbial analysis - new technologies.* IFT basic symposium series. Marcell Dekker, INC, Cap.16, p.315-3346, 1997.

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

WATNICK, P.; KOLTER, R. **Minireview: Biofilm, city of microbes.** *Journal of Bacteriology*, v.182, p.2675-7679, 2000.

WEI, H.; WOLF, G.; HAMMES, W.P. **Indigenous microorganisms from iceberg lettuce with adherence and antagonistic potential for use as protective culture.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.7, p. 294-301, 2006.

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 e Biodegradation*, v. 54, p.143 - 151, 2004.

WIESENDANGER, R. in **Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications.** R. Wiesendanger (ed.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1994.

WOLF, F.G.; SANTOS, L.O.E.; PHILIPPI, P.C. **Formação e dinâmica da interface líquido-vapor simulada pelo método Lattice-Boltzmann.** Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 28, n. 2, p. 167 - 175, 2006.