

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAYANA DE OLIVEIRA

Avaliação da contaminação microbiana durante as etapas do ciclo de produção do morangueiro



CURITIBA

2009

RAYANA DE OLIVEIRA

Avaliação da contaminação microbiológica durante as etapas do ciclo de
produção do morangueiro

Monografia apresentada à
disciplina de Estágio em Patologia
(BP024), como requisito parcial à
conclusão do curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia do
Rocio Dalzoto.

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pessoas que sempre me incentivaram, acreditaram, investiram, torceram e sonharam por mim.

Ao meu irmão por sempre acreditar e me ajudar.

Aos meus avós que sempre tiveram a certeza de me ver chegar longe, dando-me forças para conseguir tudo o que almejavam para mim. Vó Wilma e Vó Judith, onde estiverem, espero que fiquem orgulhosas. Saudade de vocês.

Ao meu namorado, amor da minha vida, pela força, pelo entusiasmo, pela crença nos nossos sonhos, pela ajuda, pelo amor.

À professora orientadora Patrícia do Rocio Dalzoto pela paciência, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela força.

À professora Ida Chapaval Pimental pelo seu bom-humor, colaboração e ensinamentos.

À professora Maria Aparecida C. Zawadneak pela total ajuda, empolgação e dedicação.

A todos os meus amigos, companheiros de laboratório, pelas ajudas, pela força, pelas alegrias, pelo divertimento e por acreditarem em mim.

Aos amigos de toda uma vida, que sempre estiveram perto, nas horas mais difíceis e mais divertidas.

Ao professor Luis Felipe Caron por ter me cedido os meios de cultura seletivos para a realização desse trabalho.

Aos colegas da graduação que conviveram intimamente comigo durante esses anos e que me mostraram a verdadeira importância de uma amizade genuína. Especialmente para a Rafa, amiga querida que compartilha gostos e sonhos comigo.

RESUMO

O morangueiro pertence à família Rosaceae, sendo as cultivares mais difundidas comercialmente pertencentes ao híbrido *Fragaria x Ananassa*. A implementação da produção integrada no cultivo do morangueiro, segundo as Normas Técnicas Específicas, em regiões nas quais o sistema ainda não está difundido, exige adequações; tendo como o contexto microbiológico um dos fatores a ser considerado. Para que o produto apresente-se dentro das normas, a Embrapa Clima Temperado, conjuntamente com outras Instituições de Pesquisa do Sul e Sudeste do País, estão implementando a Produção Integrada de Morango (PIMo), visando estimular a adoção de boas práticas, com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana.

O presente trabalho teve como objetivos analisar a qualidade microbiológica da água de irrigação, bem como investigar a microbiota presente nas mãos dos agricultores e nos utensílios usados nas etapas de produção do morango, para a obtenção de um fruto como alimento seguro. A água de duas propriedades de São José dos Pinhais foi coletada e analisada conforme os critérios estabelecidos pela Portaria N° 518 (25/03/2004) da ANVISA. Bactérias isoladas das mãos dos produtores foram identificadas em meios seletivos e os fungos, por macro e micromorfologia. O álcool 70% foi testado como agente sanificante para assepsia das mãos dos produtores após o procedimento de colheita. De acordo com os testes estatísticos, na propriedade 1, existe diferença significativa no número de UFC de bactérias, os quais foram muito maiores antes do uso do álcool 70%. Os fungos foram completamente eliminados após a aplicação do álcool 70%. Já na propriedade 2, foi possível observar que não houve diferença significativa no número de UFC de bactérias antes e após o uso do álcool ($p > 0,1$). Em relação aos fungos, observou-se que o número de UFC aumentou após a aplicação do álcool 70% ($p > 0,1$). As 2 propriedades apresentam água imprópria para a irrigação de hortaliças, de acordo com a resolução N° 357 (17/03/2005) do CONAMA. A bactéria identificada, isolada das mãos de um dos produtores pertence à espécie *Staphylococcus aureus*. Os fungos identificados, provenientes das mãos dos agricultores, pertencem aos gêneros *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. O fungo identificado, proveniente da água de irrigação das duas propriedades pertence à espécie *Aspergillus niger*. Os resultados obtidos permitirão formular propostas para que novas práticas sejam aplicadas, de modo que o produto final, destinado à mesa dos consumidores, tenha melhor qualidade.

Palavras-chave: Monitoramento microbiológico. Produção Integrada de Morango. *Fragaria x Ananassa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MAPA 1- MAPA DO BRASIL INDICANDO O MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.....	50
FIGURA 1- EXEMPLO DE LAUDO DA ANÁLISE DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO CEDIDO PARA OS PRODUTORES DAS PROPRIEDADES 1 E 2.....	56
FIGURA 2- <i>Escherichia coli</i> EM MEIO ÁGAR TEAGUE ISOLADA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO. A) PROPRIEDADE 1; B) PROPRIEDADE 2.....	58
FIGURA 3- <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1. A) MEIO ÁGAR MANITOL B) MEIO ÁGAR BAIRD PARKER.....	58
FIGURA 4- MICROMORFOLOGIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> CORADA GRAM-POSITIVAMENTE.....	59
FIGURA 5- <i>Aspergillus niger</i> ISOLADO DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA, A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....	60
FIGURA 6- <i>Aspergillus</i> sp2 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA, A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....	61
FIGURA 7- <i>Penicillium</i> sp1 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....	62
FIGURA 8- <i>Penicillium</i> sp2 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....	63
FIGURA 9- <i>Penicillium</i> sp3 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....	64
FIGURA 10- <i>Penicillium</i> sp4 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....	65

FIGURA 11- *Penicillium* sp5 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....66

FIGURA 12- *Penicillium* sp6 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....67

FIGURA 13- *Penicillium* sp7 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....68

FIGURA 14- *Penicillium* sp8 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....69

FIGURA 15- *Penicillium* sp9 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....70

FIGURA 16- *Penicillium* sp10 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL-REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS.....71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DAS MÃOS DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1 ANTES E APÓS O USO DO ÁLCOOL 70%.....51

TABELA 2 - MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DAS MÃOS DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2 ANTES E APÓS O USO DO ÁLCOOL 70%.....51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.2 OBJETVO ESPECÍFICO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 O MORANGO.....	12
2.2 MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS À CONTAMINAÇÃO DO MORANGO.....	13
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e a contaminação do morango.....	14
2.2.2 <i>Salmonella</i> sp, <i>Shigella</i> sp e <i>Escherichia coli</i> e a contaminação do morango.....	15
2.2.3 Fungos associados ao morango.....	19
2.2.4 Boas Práticas.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 COLETAS.....	24
3.2 MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	24
3.2.1 Caldo Lauril Sulfato Tryptose.....	24
3.2.2 Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante.....	24
3.2.3 Caldo EC.....	25
3.2.4 Caldo Simples.....	25
3.2.5 Ágar Simples.....	26
3.2.6 Meio de cultura Ágar Teague.....	26
3.2.7 Meio de cultura Ágar Baird Parker.....	26
3.2.8 Meio de cultura Ágar Manitol.....	27
3.2.9 Meio de cultura Ágar SS.....	27
3.2.10 Meio de cultura BDA.....	28
3.2.11 Lactofenol de Amann.....	28
3.2.12 Álcool 70%.....	28
3.3 EXAME COLIMÉTRICO DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO.....	28
3.3.1 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	29
3.3.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp.....	30
3.3.3 Provas bioquímicas (IMViC).....	30
3.4 ISOLAMENTO DE FUNGOS DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO.....	30
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	31
3.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS DAS MÃOS DOS PRODUTORES E TESTE DA EFICIÊNCIA DO AGENTE SANIFICANTE ÁLCOOL 70%.....	31
3.6.1 Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.6.1.1 Teste da catalase em lâmina para <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.6.1.2 Teste de coagulase em lâmina para <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO POR MEIO DO EXAME COLIMÉTRICO.....	34
4.1.1 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> proveniente da água de irrigação.....	35
4.1.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp proveniente da água de irrigação.....	35
4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO.....	36

4.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS DAS MÃOS DOS PRODUTORES E TESTE DA EFICIÊNCIA DO AGENTE SANIFICANTE ÁLCOOL 70%.....	36
4.3.1. Isolamento de fungos das mãos dos produtores.....	36
4.3.2 Isolamento de bactérias das mãos dos produtores.....	37
4.3.2.1. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
5 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE.....	50

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de pequenas frutas tem no morango a espécie de maior expressão em área cultivada e em valor econômico, envolvendo vários municípios da região Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Fruta muito apreciada pelo consumidor, apresenta, em seu sistema de produção, uma série de gargalos que dificultam a obtenção de uma fruta de qualidade, sem contaminantes químicos ou microbiológicos (GOMES *et al.*, 2005).

No Brasil, a atividade de produção de morangos apresenta considerável importância e se expande a cada ano. Durante as primeiras décadas do século XX, a cultura recebeu grande incentivo no Rio Grande do Sul (PADOVANI, 1991), onde é plantado, principalmente, nos municípios do vale do rio Caí. Introduzido em São Paulo, o cultivo do morangueiro desenvolveu-se comercialmente a partir de 1960, primeiro em Suzano e Itaquera, depois em Jundiaí e Vinhedo, e mais tarde em Piedade, Atibaia e Campinas. Desde então, está em constante expansão. No Paraná, Pinhalão e Curitiba se destacam (RONQUE, 1999).

Diante da exposição frequente de questões relativas à segurança alimentar e preservação ambiental, novas exigências de mercado, como a rastreabilidade, passaram a influir na competitividade de produtos agrícolas. Isso reflete especialmente nos produtos consumidos *in natura*, como o morango, cuja comercialização é afetada, por vezes, pela contaminação com resíduos de agrotóxicos (BRASIL, 2008). Soma-se a isso, a fragilidade na produção de morango quanto à sustentabilidade sócio-ambiental, por se tratar de um cultivo com grande demanda de insumos e necessidade de controle fitossanitário constante (DIAS, COSTA, CANUTO, 2007).

O morango sempre foi muito bem quisto pelos consumidores devido a suas particularidades como cores vibrantes, aroma, paladar e valor nutricional excelentes. Devido a isso, os produtores de morango sempre estão investindo para encantar ainda mais o olfato, paladar e a visão de seus consumidores. Para isso a busca por procedimentos seguros torna-se constante. O uso demasiado de agrotóxicos e a possibilidade de contaminação durante o processamento do fruto estão sempre sendo evitados, o que aumenta a rentabilidade e a qualidade

do fruto. Se há falhas durante o processo o produto estará mais suscetível à contaminação por agentes patogênicos, como fungos e bactérias, prejudicando a qualidade da produção. Esses microrganismos trazem danos à plantação, deteriorando os frutos e diminuindo a produtividade da colheita. Alguns destes, ainda podem ser patogênicos ao homem, influenciando, assim, na saúde do mesmo. Com isso o controle fitossanitário deve ser cada vez mais rigoroso.

A implementação do sistema de produção integrada e o desenvolvimento da cadeia produtiva do morango no Estado do Paraná, baseados em Normas Técnicas Específicas da Produção Integrada do Morango (NTEPI-Morango), irá favorecer a intensificação de seu cultivo e comércio de forma sustentável.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto é monitorar a microbiota presente durante o ciclo do cultivo do morangueiro.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a qualidade microbiológica da água de irrigação, por meio do exame colimétrico da água;
- Identificar bactérias e fungos isolados da água de irrigação e das mãos dos produtores;
- Testar a eficiência do álcool 70% como agente sanificante para ser usado nas mãos dos produtores durante o processo de colheita.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Morango

O morango (*Fragaria* sp) é uma planta herbácea, rasteira e perene da família Rosaceae, propagada por via vegetativa, através de estolhos. Em geral, a cultura para produção de frutos é renovada anualmente. A parte comestível é um pseudofruto, originário do receptáculo floral que se torna carnoso e suculento. Seu cultivo é bastante desenvolvido em vários países do mundo, especialmente nos de clima temperado (FERLA, MARCHETTI, GONÇALVES, 2007).

No Brasil, a cultura do morangueiro é uma importante atividade de famílias de pequenos e médios agricultores. No Estado do Rio Grande do Sul, embora cultivado há muitos anos, a partir da década de 1990 passou a ter importância comercial, ocupando grande contingente de mão de obra, sendo de grande importância econômica e social. Normalmente é feita por produtores estabelecidos em minifúndios que utilizam a mão de obra familiar para a produção (GARCIA; CHIAVEGATO, 1997).

O morangueiro é tradicionalmente cultivado em campo, em canteiros geralmente cobertos com plástico preto. O espaçamento entre as plantas fica, em geral, entre 30x30cm e 30x35 cm, resultando no plantio de 65 a 80 mil plantas/ha, de acordo com o espaçamento e a área de carregadores. A irrigação é imprescindível e geralmente realizada por aspersão. Doenças associadas ao solo, causadas por fungo ou bactéria, tem constituído a principal causa de perdas para a cultura (FERNANDES *et al.*, 2002).

A cultura do morango, *Fragaria x ananassa* Duchesne, é muito difundida no Brasil, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, Distrito Federal e Goiás, devido à sua alta rentabilidade. A produtividade e a qualidade dos frutos de morango são muito influenciadas pelo fotoperíodo, temperatura, período de dormência, pragas, doenças, condições do solo, adubação, flutuações na umidade do ar e de solo, entre outros. Conseqüentemente, cultivares de morangueiro diferem muito de acordo com a sua adaptação condição regional e ambiental, fazendo com que uma cultivar que se desenvolve satisfatoriamente em uma região não

apresente o mesmo desempenho em outro local com condições ambientais diferentes (2º SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2004).

2.2 Micro-organismos associados à contaminação do morango

A contaminação de alimentos tem aumentado a cada ano, e atualmente representa um risco potencial para a saúde humana. Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar ao desenvolvimento de doenças, afetando a saúde humana, desencadeada por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas (PASSOS, KUAYE, 1996).

Todos os alimentos devem ser objeto de exames microscópicos e microbiológicos para elucidar a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos. Estes exames refletem as condições higiênicas que envolvem a produção, armazenamento, transporte e manuseio do alimento. Os problemas encontrados podem ser minimizados através de sistemático controle de qualidade e programas de educação sanitária (LIVERA *et. al.*; TAVARES, LOBANCO, SAKUMA, 1996).

As alterações microbiológicas que ocorrem em vegetais variam segundo a composição da microflora de cada alimento, que por sua vez está relacionada com outros fatores. O ambiente, a manipulação, a água disponível e a umidade, a temperatura, a atmosfera e a acidez são os mais importantes. De maneira geral, as alterações são causadas por: mesófilos, bactérias ácidas lácticas, coliformes totais e fecais, bactérias pectinolíticas, leveduras e fungos (WATADA; KO; MINOTT, 1996).

O ambiente é o primeiro fator contaminante dos alimentos. O solo, por exemplo, é rico em bactérias Gram positivas e fungos, que podem contaminar os alimentos diretamente ou ser transportados pelo vento ou por insetos. O ar serve mais como veículo do que como meio de crescimento. A chuva pode arrastar terra para produtos cultivados próximo ao solo e elevar sua carga microbiana, além de aumentar a umidade e favorecer o crescimento de fungos em até 72% (BRACKETT, 1997).

Segundo Brackett (1997), a temperatura é, provavelmente, o fator mais importante que afeta o crescimento de micro-organismos. Como as frutas e

hortaliças são cultivadas e colhidas em temperatura ambiente, nos países de clima quente como o Brasil, é comum a predominância de bactérias mesofílicas.

Entretanto, o tratamento de refrigeração que ocorre na maioria dos alimentos minimamente processados pode modificar este quadro, contribuindo para a predominância de psicrófilos. Temperaturas de refrigeração exercem efeito de redução da proliferação microbiana em frutas e hortaliças (VAROQUAUX; WILEY, 1997).

Entre os patógenos entéricos, as bacterias *Shigella* sp e *Salmonella* sp podem ser veiculadas por frutas e hortaliças, mas encontram dificuldade para crescer sob refrigeração, podendo sobreviver por longos períodos nestas temperaturas. Assim, é importante evitar variações de temperaturas durante o armazenamento, pois temperaturas mais elevadas podem permitir o crescimento destes patógenos. No caso de *Shigella* sp. apenas 10 células são suficientes para causar enfermidade (BRACKETT, 1997).

A espécie *Escherichia coli* é um psicotrófico patogênico entérico que pode, tal qual *Salmonella* sp levar o indivíduo à morte (BRACKETT, 1997). Outros dois psicotróficos importantes são *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes* (BRACKETT, 1997; NGUYENTHE; CARLIN, 1994).

2.2.1 *Staphylococcus aureus* e a contaminação do morango

A qualidade da matéria prima alimentar, as condições do ambiente de trabalho, as características do equipamento e dos utensílios e as condições técnicas do material de limpeza têm sua importância, mas nada suplanta o papel da manipulação e a própria saúde dos manipuladores na epidemiologia das doenças transmitidas pelos alimentos (MEYER *et al.*, 2005). A manipulação permite a contaminação cruzada pelos trabalhadores e determinados recipientes com superfícies desiguais ou salientes podem rasgar hortaliças e cascas de frutas (BRACKETT, 1997).

Algumas características dos estafilococos respondem por sua patogenicidade, que se apresenta de várias formas. Eles crescem comparativamente bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que, parcialmente explica, como *Staphylococcus aureus* podem crescer em alguns alimentos que apresentam alta pressão osmótica (tais como

presunto e outras carnes curtidas) ou em alimentos com pouca umidade que tendem a inibir o crescimento de outros micro-organismos. Além disso o pigmento amarelo provavelmente confere alguma proteção para os efeitos antimicrobianos do sol (TORTORA, 2005).

Staphylococcus aureus produz muitas toxinas que contribuem para a patogenicidade da bactéria, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos. A infecção de cortes cirúrgicos por *Staphylococcus aureus* é um problema comum em hospitais; e a habilidade de desenvolver resistência rapidamente aos antibióticos como penicilina contribui para seu perigo para pacientes em ambientes hospitalares. *Staphylococcus aureus* produz a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico, uma infecção grave caracterizada por febre alta e vômitos, algumas vezes ocasionando a morte. Também produz uma enterotoxina que causa vômitos e náuseas quando ingerida; esta é uma das causas mais comuns da intoxicação alimentar (TORTORA, 2005).

Esta bactéria se apresenta como um coco Gram positivo, imóvel, medindo de 0,5 a 1,0 micrômetro, agrupando-se em massas irregulares que lembram cachos de uvas. São anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento em torno de 30 a 37°C (WILLIAMS; WILKINS, 1994).

A intoxicação alimentar causada por este micro-organismo é devida à contaminação de alimentos pelas exotoxinas (enterotoxinas) produzidas pela bactéria. Estas são termoestáveis e podem permanecer no alimento mesmo após o cozimento. Dentre as intoxicações alimentares de origem bacteriana no mundo, cerca de 45% estão relacionadas com *Staphylococcus aureus* (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Após um curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento, estas intoxicações são caracterizadas por náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (PASSOS; KUAYE, 1996).

2.2.2 *Salmonella* sp, *Shigella* sp e *Escherichia coli* e a contaminação do morango

Thunberg *et. al.* (2002) afirma que o aumento da demanda por produtos frescos organicamente cultivados tem aumentado o risco de contaminação por coliformes fecais. Segundo o autor, a contaminação pode ocorrer no processo

de produção, no processamento, ou até mesmo por contaminação cruzada, sem que a qualidade aparente do produto seja prejudicada. Vários são os fatores que podem ocasionar a contaminação em alguma fase do processo, que vai do plantio na fazenda até a mesa do consumidor: água usada na irrigação, fertilizantes de origem animal, mão contaminada do trabalhador rural, ou, na fase de processamento, desinfecção ineficiente, entre outros.

Cerca de 200 doenças podem ser transmitidas ao homem pelos alimentos. Os agentes etiológicos podem ser: bactérias, fungos, vírus, parasitas, agentes químicos e substâncias tóxicas de origem animal e vegetal. No caso dos orgânicos, se houver contaminação, é pelo grupo das enterobactérias: *Shigella* (shigelose), *Salmonella* (salmonelose, febre tifóide, febre paratífóide), *Yersinia enterocolitica* (yersiniose), *Escherichia coli*, *dentre outras*. No caso dos orgânicos, se houver contaminação, é pelo grupo das enterobactérias: *Shigella* (shigelose), *Salmonella* (salmonelose, febre tifóide, febre paratífóide), *Yersinia enterocolitica* (yersiniose), *Escherichia coli*, *dentre outras*.

Os micro-organismos patogênicos não são facilmente detectados no processo produtivo; seus efeitos na saúde do consumidor são, na maioria das vezes, de difícil identificação após o consumo, pois os sintomas apresentados se relacionam com diversos quadros clínicos (SILVA, 1997).

A qualidade microbiológica de alimentos que sofreram processamento mínimo está relacionada à presença de micro-organismos deteriorantes que irão influenciar as alterações sensoriais do produto durante sua vida útil. Contudo, a maior preocupação está relacionada à sua segurança, não apresentando contaminação por agentes químicos, físicos e microbiológicos em concentrações prejudiciais à saúde (VANETTI, 2004).

A produção e o consumo de morangos inócuos para o consumo humano, livres de contaminações microbiológicas e de resíduos de agrotóxicos, produzidos com uma clara consciência de respeito ao homem e aos recursos naturais converte-se em uma oportunidade viável para a fruticultura. O significativo aumento da demanda por esse tipo de produto, reflete uma nova orientação nas preferências dos consumidores, para morangos gerados com técnicas não agressivas ao meio ambiente e seguros para a saúde. É evidente que o sistema de produção agrícola convencional não atende a demanda crescente por este tipo de fruta. Dentro desse novo cenário, o sistema de

produção integrada de morango vem satisfazer as demandas exigidas pelos consumidores (3º SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2007).

Os coliformes são micro-organismos indicadores de condições sanitárias indesejáveis. A presença destes micro-organismos não indica necessariamente contaminação fecal, uma vez que a maioria dos coliformes é encontrada no ambiente. Este tipo de contaminação só é confirmado com a presença de *Escherichia coli*, que está presente no intestino do homem e é resistente fora dele. A presença de *Escherichia coli* indica contaminação fecal recente (TORTORA, 2005). Além disso, segundo Siqueira (1995), indicam condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento, e altas contagens podem significar contaminação pós-processamento, limpezas e sanitizações deficientes e tratamentos térmicos ineficientes.

A espécie *Salmonella* spp é um micro-organismo amplamente difundido na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais. Barros, Pavia e Panetta (2002) confirmam que os mais variados tipos de alimentos estão envolvidos em surtos de infecção alimentar com *Salmonella*, mas ela é encontrada, principalmente, em alimentos de origem animal, como ovos e carnes de aves e seus derivados.

O gênero *Salmonella* é um patógeno importante que causa doenças veiculadas por alimentos e é um dos principais agentes de doenças gastrointestinais (TORTORA, 2005). Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de toxi-infecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento (GALLO; ÁVILA, 1996).

As doenças causadas por *Salmonella* se subdividem em três grupos : a febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*, as febres entéricas, causadas pela *Salmonella paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonellas (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

O reservatório dos integrantes do gênero *Salmonella* sp é o trato gastrointestinal de animais de sangue frio e quente. Fontes de infecção incluem solo contaminado, vegetação, água e componentes de rações animais (tais como farinhas de peixe, carne e ossos), particularmente aquelas contendo

derivados de leite, carne e ovos, e fezes de animais infectados (HIRSH; ZEE, 2003).

A incidência de salmonelose humana vem aumentando em várias partes do mundo, mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico utilizado na produção de alimentos e a adoção de melhores medidas higiênicas. A preocupação com a qualidade dos alimentos envolve não só os riscos de veiculação de enfermidades para o consumidor, mas também perdas econômicas devidas às alterações microbianas ocorridas no alimento. Os surtos de salmonelose humana podem ter um custo bastante elevado, pois devem ser computados os custos médicos e as perdas de produtividade (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

De acordo com Guimarães *et al.* (2001), *Salmonella* sp é um dos principais agentes envolvidos em surtos de origem alimentar, sendo um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos quanto nos subdesenvolvidos, porém nem sempre são notificados, pois, geralmente ela é mal diagnosticada pelo paciente ou mesmo pelo médico. Apenas 10% do número real de surtos de toxi-infecções alimentares são confirmados, devido ao atual estado de desenvolvimento dos serviços de vigilância epidemiológica e a falta de conscientização da população frente ao problema.

Segundo Jay (1994), o gênero *Shigella* sp pertence à família Enterobacteriaceae. São descritas quatro espécies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*. O homem pode ser afetado pelas quatro espécies (HIRSH; ZEE, 2003).

A doença bacteriana aguda, causada por *Shigella*, envolve o intestino delgado e é conhecida como disenteria bacilar (CVE, 2003).

O reservatório de *Shigella* é o intestino grosso de animais ou humanos clinicamente doentes, convalescentes ou assintomáticos (HIRSH; ZEE, 2003).

De acordo com Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) (2003), as medidas de controle são: 1) notificação de surtos. 2) medidas preventivas – educação sanitária; saneamento básico; higiene rigorosa pessoal para os manipuladores de alimentos, com ênfase na lavagem das mãos e procedimentos rigorosos de limpeza em ambientes/instituições fechadas. 3) medidas em epidemias – investigação do surto e detecção da fonte de transmissão. Orientações básicas sobre higiene pessoal e medidas sanitárias gerais.

Na PIMO, foi investigada a presença de bactérias da Família Enterobacteriaceae, como os gêneros *Escherichia* sp, *Salmonella* sp e *Shigella* sp, juntamente com outras enterobactérias e o grupo de coliformes totais que é usado como índice para avaliar as condições higiênicas. Altas contagens significam contaminação pós-processamento; limpezas e sanificações deficientes; tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem (3º SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001), estabelece, na resolução (RDC) nº 12, de 2 de janeiro de 2001, os padrões microbiológicos sanitários para alimentos. Conforme a ANVISA, para morangos frescos, *in natura*, inteiros, selecionados ou não, não é permitida a presença de *Salmonella* sp. em amostras de 25 g.

2.2.3 Fungos associados ao morango

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados e quimiotróficos, obtendo energia através de reações químicas, nas quais substratos adequados são oxidados (TORTORA *et al.*, 2005). Ubíquos, são encontrados no ar, no solo, na água, nos vegetais e nos animais. Formam um grupo complexo e divergente de micro-organismos constituídos por centenas de espécies (APHA, 2001).

A porção do micélio que penetra no substrato e é responsável pela absorção de água e nutrientes é o micélio vegetativo; a porção projetada acima do substrato é o micélio aéreo, também denominado de micélio reprodutivo, pois a partir dessa porção são originados os corpos de frutificação portadores dos conídios (KONEMAN; ROBERTS, 2001).

Os fungos constituem um grupo diversificado de organismos que apresentam grande importância ecológica e econômica. Cerca de 70.000 espécies de fungos já foram descritas, entretanto, estima-se que o número total seja de aproximadamente 1,5 milhão. Esses organismos são considerados de grande importância por várias razões: são os decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres, constituem importantes associações simbióticas com plantas vasculares (micorrizas), constituem a avassaladora maioria dos patógenos de plantas, oferecem sistemas genéticos para os

biologistas moleculares, e são cruciais para a biotecnologia industrial (LI; MARQUARDT; ABRAMSON, 2000).

Todavia, são indesejáveis nos alimentos porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os alimentos, provocam a sua deterioração. Além disso, muitos fungos podem produzir metabólitos tóxicos quando estão se multiplicando nos alimentos. Estes metabólitos recebem a denominação genérica de “micotoxinas”, e correspondem a produtos metabólicos secundários que, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto no homem quanto nos animais (micotoxicoses) (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo, uma vez que sem o crescimento, geralmente a produção não ocorre. Entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorrer. Portanto, o entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para o desenvolvimento de métodos de controle (BULLERMAN, SCHROEDER, PARK, 1984).

A contaminação de alimentos por micotoxinas pode ocorrer no campo, na colheita, no transporte, no armazenamento e/ou na manufatura dos produtos (SMITH; HENDERSON, 1991). Alguns fatores que influenciam a produção de micotoxinas são: composição do substrato, temperatura, teor de água, umidade relativa do ar, atividade de água, pH, atmosfera, competição microbiana, danos causados por insetos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (BULLERMAN *et al.*, 1984; COULOMBE, 1991; FRISVAD; SAMSON, 2004; SCUSSEL, 1998; WATSON, 1987), sendo que a temperatura, umidade e tipo de substrato são os mais importantes (MALLOZZI; CORRÊA, 1998).

Os fungos toxigênicos pertencem basicamente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os quais são responsáveis pela produção da maioria das micotoxinas até hoje conhecidas e estudadas. As espécies de *Fusarium* são patógenos de plantas, produzindo micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (SWEENWEY; DOBSON, 1998).

A oferta de alimentos isentos de agentes patogênicos, que possam pôr em risco a saúde do consumidor, assumiu mundialmente uma grande relevância em saúde pública. Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento das

doenças transmitidas por alimentos, relacionado a vários fatores, tais como: o desenvolvimento econômico, a globalização do comércio de alimentos, a intensificação da urbanização e as modificações dos hábitos alimentares dos consumidores, o aumento do consumo de alimentos frescos ou "in natura", a preferência por alimentos prontos ou semi-prontos e o consumo de refeições fora do domicílio (ORLANDI *et al.*, 2002)

2.2.4 Boas Práticas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), "a alimentação deve ser disponível em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar". Alimentos contaminados são nocivos à saúde das pessoas que os consomem, provocando diversas enfermidades. Dados demonstram que os agentes etiológicos são, na maioria das vezes, micro-organismos, e a contaminação pode ocorrer em diversas fases do processamento do alimento. Dessa forma, são necessárias medidas de controle em todas as etapas do processamento: colheita, conservação, manipulação, transporte, armazenamento, preparo e distribuição dos alimentos (BOULOS, 1999).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são um conjunto de normas empregadas em produtos, processos, serviços e edificações, visando a promoção e a certificação da qualidade e da segurança do alimento. No Brasil, as BPF são legalmente regidas pelas Portarias 1428/93-MS (BRASIL, 1993) e 326/97-SVS/MS (BRASIL, 1997). A qualidade da matéria-prima, a arquitetura dos equipamentos e das instalações, as condições higiênicas do ambiente de trabalho, as técnicas de manipulação dos alimentos, a saúde dos funcionários são fatores importantes a serem considerados na produção de alimentos seguros e de qualidade, devendo, portanto, serem considerados nas BPF (ARRUDA, 1996).

Para atender à legislação em vigor (BRASIL, 2001) e não colocar em risco a saúde dos usuários, com a veiculação de micro-organismos patogênicos, deve-se controlar a contaminação, a multiplicação e a sobrevivência microbiana nos diversos ambientes, tais como: equipamentos, utensílios e manipuladores, o

que contribuirá para a obtenção de alimentos com boa qualidade microbiológica (HAZELWOOD, 1994).

Dentre as doenças transmitidas pelos alimentos, têm-se as de origem física, química e microbiológica (GERMANO, GERMANO, KAMEI, 2000). As toxi-infecções alimentares de origem microbiana têm sido reconhecidas como o problema de saúde pública mais abrangente no mundo atual e causa importante na diminuição da produtividade, das perdas econômicas que afetam os países, empresas e simples consumidores (MICHELOTTI, 2002).

Em Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN), é reconhecida a transferência de micro-organismos aos comensais, via alimentação, proveniente de diversas fontes, além do próprio alimento, principalmente por aqueles que não ganharam tratamento térmico ou não o receberam adequadamente. Os funcionários destas Unidades podem estar infectados e contaminar o alimento pelo uso de técnicas de processamento inadequadas, transferindo micro-organismos ao comensal, possibilitando, com isso, uma toxi-infecção alimentar (SOUSA; SALLES; MORMELLO, 2001).

Nos aerossóis utilizados nos ambientes de processamento, encontram-se, principalmente, esporos de bactérias e fungos e, ainda, leveduras. Por outro lado, quando os manipuladores são a principal causa da contaminação microbiana desses ambientes, há predominância de formas vegetativas de bactérias, entre as quais estão incluídas as espécies dos gêneros *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Micrococcus* sp e outros organismos relacionados com o trato respiratório, com a pele e com o cabelo (SVEUM *et al.*, 1992; SALUSTIANO, BRABES, ANDRADE, 2001).

Em várias pesquisas, tem-se demonstrado a relação existente entre manipuladores de alimentos e doenças bacterianas de origem alimentar. Podem ser manipuladores doentes, ou portadores assintomáticos, ou que apresentem hábitos de higiene pessoal inadequados, ou ainda que usem métodos anti-higiênicos na preparação de alimentos (CARDOSO *et al.*, 1996). Mesmo os manipuladores sadios abrigam bactérias que podem contaminar os alimentos pela boca, nariz, garganta e trato intestinal.

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), os manipuladores são responsáveis direta ou indiretamente por até 26% dos surtos de enfermidades bacterianas veiculadas por alimentos (FREITAS, 1995).

Equipamentos e utensílios com higienização deficiente têm sido responsáveis, isoladamente ou associados a outros fatores, por surtos de doenças de origem alimentar ou por alterações de alimentos processados (ANDRADE; MACEDO, 1996). Há relatos de que utensílios e equipamentos contaminados participam do aparecimento de aproximadamente 16% dos surtos (FREITAS, 1995). Cortadores de frios, cortadores de legumes, bandejas, pratos, talheres, tabuleiros, placas de altileno, amaciadores de carne, entre outros, devem passar constantemente por uma avaliação microbiológica para controle da eficiência do procedimento de higienização, evitando-se a contaminação dos alimentos produzidos (ANDRADE; MACEDO, 1996).

A atuação dos profissionais responsáveis pela qualidade nas unidades industriais de alimentação e nutrição deve ser eminentemente preventiva. Fundamentado em planos de amostragem bem definidos, o monitoramento por meio da avaliação microbiológica do ambiente, dos equipamentos, dos utensílios e dos manipuladores pode melhorar sensivelmente a qualidade dos alimentos servidos aos usuários (ANDRADE *et al.*, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETAS

Foram realizadas, durante o período da colheita do morango (de novembro a janeiro) 3 visitas durante o processo de colheita em duas propriedades produtoras de morango em São José dos Pinhais, Região Metropolitana de Curitiba (Figura 1-APÊNDICE). Uma das propriedades pertence a colônia Rio Pequeno (área experimental PIMo 03 - Coordenadas UTM 686331, 7173501) e a outra pertence a Gamelas (área experimental PIMo 04 - Coordenadas UTM 691000,7167513).

A análise laboratorial foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Patologia, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

3.2.1 Caldo Lauril Sulfato Triptose (MALLMANN & DARBY, 1941)

Composição	Concentração (g/L)
Triptose.....	20,0
Lactose.....	5,0
Cloreto de sódio.....	5,0
Fosfato Dipotássico.....	2,75
Fosfato Monopotássico.....	2,75
Lauril Sulfato de sódio.....	0,1
pH Final (a 25°C): 6.8 ± 0.2.	

Foram dissolvidos 35.6 gramas em 1000mL de água destilada. O conteúdo foi distribuído em tubos, contendo tubos invertidos de Durham, e esterilizado na autoclave sob temperatura de 121°C por 20 minutos.

3.2.2 Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante

Composição	Concentração (g/L)
------------	--------------------

Digestão péptica de tecido animal.....	10,0
Lactose.....	10,0
Bile de boi.....	20,0
Verde Brilhante.....	0,0133
pH Final (a 25°C): 7.2 ± 0.1.	

Foram dissolvidos 40 gramas em 1000mL de água destilada e aquecido até ferver para dissolver o meio completamente. O conteúdo foi distribuído em tubos, contendo tubos de Durham invertidos, e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.2.3 Caldo EC

Composição	Concentração (g/L)
Caseína enzimática hidrolisada.....	20,0
Lactose.....	5,0
Mistura de sais biliares.....	1,5
Fosfato Dipotássico.....	4,0
Fosfato Monopotássico.....	1,5
Cloreto de sódio.....	5,0
pH Final (a 25°C): 6.9 ± 0.2.	

Foram dissolvidos 37 gramas em 1000mL de água destilada e aquecido até ferver para dissolver o meio completamente. O conteúdo foi distribuído em tubos, contendo tubos de Durham invertidos, e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.2.4 Caldo Simples

Composição	Concentração (g/L)
Extrato de carne	0,3
Peptona	1,0
Cloreto de sódio	0,5
Água destilada	100,0 mL

Todos os compostos foram misturados, sendo esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.2.5 Ágar Simples

Composição	Concentração (g/L)
Peptona Especial	23,0
Amido.....	1,0
Cloreto de Sódio.....	5,0
Ágar.....	10,0
pH Final (a 25°C): 7.3 ± 0.2.	

Todos os compostos foram misturados, sendo esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.2.6 Meio de cultura Ágar Teague (Levine) (Traduzido de ATLAS, 1999)

Composição por litro	
Ágar	15.0g
Lactose	10.0g
Peptona.....	10.0g
K ₂ HPO ₄	2.0g
Eosina Y	0.4g
Azul de metileno.....	0.065mg
pH final (a 25°C): 7.1 ± 0.2.	

Os componentes foram adicionado em 1000 mL de água destilada, aquecidos e autoclavados a 121°C por 20 minutos.

3.2.7 Meio de cultura Ágar Baird Parker

Composição	Concentração [g/L]
Triptona.....	10,0
Extrato de carne.....	5,0

Extrato de levedura.....	1,0
Piruvato de sódio.....	10,0
Glicina.....	12,0
Cloreto de lítio hexahidratado.....	5,0
Ágar.....	15,0

ph final (a 25°C): 7,0 ± 0,2.

O meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. Resfriado a 45°C e foi adicionado, para cada 950 mL de meio, 50 mL de emulsão gema de ovo e 10 mL de uma solução de Telurito de Potássio a 1%.

3.2.8 Meio de cultura Ágar Manitol

Composição	Concentração [g/L]
Caseína enzimática hidrolisada.....	10,0
Nitrato de Potássio.....	1,0
Manitol.....	7,5
Vermelho de fenol.....	0,04

pH Final (a 25°C): 7.6± 0.2.

Os componentes foram adicionado em 1000 mL de água destilada, aquecidos e autoclavados a 121°C por 20 minutos.

3.2.9 Meio de cultura Ágar SS (*Salmonella Shigella*) (Traduzido de ATLAS, 1999)

Composição por litro

Ágar.....	13,5g
Lactose	10,0g
Sais biliares	8,5g
Na ₂ S ₂ O ₃	8,5g
Citrato de sódio.....	8,5g
Extrato de carne.....	5.0g

Caseína.....	2.5g
Peptídio digerido de tecido animal.....	2.5g
NaCl	65.0g
Triptose.....	10.0g
pH (a 25°C): 7.4 ± 0.2.	

Os componentes foram adicionado em 1000 mL de água destilada, aquecidos e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

3.2.10 Meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar)

Composição	Concentração [g/L]
BDA.....	39,0g
Água destilada.....	1000mL

O meio foi preparado conforme indicação do fabricante, sendo então esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.2.11 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)

Composição	Concentração [g/L]
Ácido láctico.....	10,0g
Ácido fênico.....	10,0g
Glicerina.....	20,g
Água destilada.....	10,0mL

3.2.12 Álcool 70%

Álcool absoluto diluído em água.

3.3 EXAME COLIMÉTRICO DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO

Amostras da água de irrigação das duas propriedades foram coletadas em frascos de vidro previamente esterilizados e processadas

imediatamente no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Patologia, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

A contagem de coliformes totais e fecais foi realizada através da Técnica dos Tubos Múltiplos. A contagem dos coliformes totais foi realizada em Caldo Lauril Sulfato Triptose (item 3.2.1.). Foi feito o teste presuntivo que consiste na semeadura de volumes determinados da amostra em 5 tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (item 3.2.1.), que são incubados a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, ocorrendo uma seleção inicial de organismos que fermentam a lactose com produção de gás. Portanto, a formação de gás (detectada através do tubo de Durham invertido) a partir da fermentação da lactose é prova presuntiva para a presença de bactérias do grupo coliforme.

Depois, foi feito o Teste Confirmatório que consiste na transferência de cultura de todos os tubos positivos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (item 3.2.1.), incubados durante 24 horas a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para tubos contendo C.L.V.B.B. (Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile) (item 3.2.2.), que são incubados durante 24 horas.

A confirmação de coliformes termotolerantes foi feita em caldo EC (Difco) (item 3.2.3.). Esse teste consiste na transferência das culturas de todos os tubos positivos de Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile (item 3.2.2.) incubados durante 24 horas a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para tubos contendo Caldo E.C (item 3.2.3.). Os tubos foram incubados durante 24 horas a $44,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em banho-maria com agitação e temperatura constantes. Havendo turvação e produção de gás neste meio o resultado será positivo.

A determinação quantitativa foi realizada de acordo com a técnica do NMP (Número Mais Provável), recomendada pela *American Public Health Association* (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992). O resultado é expresso como número de células por 100 mL de amostra.

3.3.1 Pesquisa de *Escherichia coli*

A pesquisa da bactéria *Escherichia coli* para a água de irrigação foi feita através da inoculação e espalhamento, com alça de Drigalski, de 0,1 mL do caldo EC (item 3.2.3.), proveniente da análise de água das duas propriedades,

em placas contendo Ágar Teague (item 3.2.6.). Sendo resultado positivo a presença de colônias bacterianas com características sugestivas de *Escherichia coli*. As placas foram incubadas a 44,5 +/- 0,2 por 24 horas. A partir das colônias sugestivas de *Escherichia coli* crescidas no meio Ágar Teague (item 3.2.6.), foram realizadas as provas bioquímicas de IMViC (Indol, Vermelho de Metila/ Voges-Proskauer e Citrato), de acordo com a técnica descrita por VANDERZANT; SPLITTSOESSER, 1992.

3.3.2 Pesquisa de *Salmonella* sp e *Shigella* sp

A pesquisa de *Salmonella* sp e *Shigella* sp na água de irrigação foi feita através da técnica de esgotamento da alça de níquel cromo, do material proveniente do Caldo Lauril Sulfato Triptose (item 3.2.1.), com resultado positivo, proveniente da análise de água das duas propriedades, em ágar SS (item 3.2.9.).

Com o aparecimento de colônias suspeitas de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. o resultado foi considerado positivo.

3.3.3 Provas bioquímicas (IMViC)

Série de provas que permite diferenciar os principais grupos de *Enterobacteriaceae*, baseando-se nas suas propriedades bioquímicas e nas reações enzimáticas na presença de substratos específicos.

Estas provas seguiram a metodologia descrita pela APHA (1998).

3.4 ISOLAMENTO DE FUNGOS DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO

Para a pesquisa de fungos da água de irrigação foi inoculado 1,0 mL da amostra de água coletada nas duas propriedades, em placas contendo meio BDA (Meio Batata Dextrose Ágar- Item 3.2.10), e espalhado, com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 7 e 14 dias.

Após o período de incubação realizou-se o isolamento dos fungos em placas contendo Meio BDA (Meio Batata Dextrose Ágar- Item 3.2.10). Os isolados novamente foram incubados em estufa a 28°C por 7 dias. Os isolados foram, então, agrupados de acordo com sua morfologia colonial.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação dos isolados foi feita pela técnica do microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999), em que placas de Petri com uma lâmina e um pedaço de algodão foram esterilizadas em autoclave por 40 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 121°C. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura BDA foi cortado e colocado sobre um lâmina contida no interior da placa. Repicou-se o isolado nos quatro lados do cubo, o qual foi posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada em estufa por 7 a 14 dias, a aproximadamente 28°C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann (item 4.2.11.), sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

A identificação foi realizada através de observações de corpos de frutificação em lâminas após incubação por 7 e 14 dias, respectivamente, a 27°C aproximadamente, ao microscópio óptico (HAZEN; GORDON; REED, 1973; BARNETT; HUNTER, 1987; LARONE, 1987; KERN, 1988; KLICH; PITT, 1988; HERRERA; ULLOA, 1990; MENEZES; OLIVEIRA, 1993).

3.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS DAS MÃOS DOS PRODUTORES E TESTE DA EFICIÊNCIA DO AGENTE SANIFICANTE ÁLCOOL 70%

Após os procedimentos rotineiros de colheita realizados pelos produtores, friccionou-se um *swab* nas mãos destes, contemplando as seguintes regiões: palmas das mãos, dedos e entre os dedos. Estes *swabs* foram imersos em tubos contendo Caldo Simples (item 3.2.4) para que fosse feita, posteriormente, em laboratório, a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em Ágar

Simples (item 3.2.5) para o isolamento de bactérias e BDA (item 3.2.10) para o isolamento de fungos.

Em seguida, foi aplicado nas mãos dos produtores o agente sanificante Álcool 70% (item 3.2.12) e procedeu-se a metodologia descrita acima para o isolamento de bactérias e fungos.

As bactérias isoladas foram identificadas por meio das metodologias descritas abaixo. Os fungos foram identificados conforme descrito no item 3.5.

O procedimento de contagem das UFC, em Ágar Simples e em BDA, foi realizado em 10 repetições. Realizou-se, então, a contagem de UFC de cada repetição e os dados foram transformados para $\log(x+1)$. O experimento consistiu de um delineamento inteiramente casualizado e os dados foram analisados por meio de uma análise de variância, seguida do teste de Tukey para comparação de médias a 5%, por meio do software Assistat 7.5 2008 (SILVA; AZEVEDO, 2006).

3.6.1 Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* proveniente das mãos dos produtores foi feita através do estriamento, com o auxílio da alça de níquel cromo, em meio Manitol (item 3.2.8), do material proveniente do Caldo Simples (item 3.2.4.), com resultado positivo, onde foi imerso o *swab* proveniente da análise das mãos dos produtores das duas propriedades. Foi considerado resultado positivo o aparecimento de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em meio manitol (item 3.2.8), e a mudança de cor do meio, de vermelho para amarelo.

Essas colônias suspeitas foram isoladas e repicadas em placas contendo meio Baird Parker (BP) (item 3.2.7) e incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas. Foi considerado resultado positivo o aparecimento de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em meio BP (item 3.2.7).

Para a confirmação da suspeita de *Staphylococcus aureus* também foi feito o teste da catalase e coagulase em lâmina.

3.6.1.1 Teste da catalase em lâmina para *Staphylococcus aureus*

Fez-se o esfregaço de duas a três colônias da bactéria em uma lâmina. Sobre essas colônias foram pingadas de duas a três gotas de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Esse teste é feito para se diferenciar *Streptococcus* sp de *Staphylococcus* sp e testa a capacidade de algumas bactérias converterem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). O teste de catalase negativo exclui a presença de *Staphylococcus aureus*.

3.6.1.2 Teste de coagulase em lâmina para *Staphylococcus aureus*

Utilizou-se o reagente Staphyclin- Slidex Staphclin Látex Agglutination test (Laborclin, Paraná, Brasil).

A coagulase é uma adesina produzida por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*. No laboratório é usada para distinguir diferentes isolados de *Staphylococcus*. O teste de coagulase negativo exclui a presença de *Staphylococcus aureus*.

A metodologia foi seguida de acordo com a indicação do fabricante.

Reagentes:

- Staphclin látex: Suspensão de partículas de látex róseas, sensibilizadas com proteínas plasmáticas antígeno-específicas;
- Staphclin controle positivo: Suspensão celular de *Staphylococcus aureus* não viáveis, derivados da cepa ATCC® 25923;
- Staphclin controle negativo: Suspensão celular de *Staphylococcus pidermides* não viáveis, derivados da cepa ATCC® 12228;
- Solução salina: Solução 0,15M de cloreto de sódio.

Observação: Todos os reagentes contém azida sódica a 0,1% como preservativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO POR MEIO DO EXAME COLIMÉTRICO

De acordo com a Técnica dos Tubos Múltiplos, considera-se resultado positivo o tubo que apresentar turvação do meio e produção de gás detectada através do tubo de Durham. Ambas as propriedades apresentaram resultado positivo em todos os tubos da análise, apresentando 1600 coliformes totais/100 mL e 1600 coliformes fecais/100 mL de água.

Bonilha (1986) e Barros *et al.* (1999) chamaram atenção para os possíveis riscos à saúde pública, uma vez que os coliformes totais, apesar de não causarem doenças, também habitam o intestino de animais mamíferos, inclusive o homem, podendo indicar uma possível contaminação da água e hortaliças com bactérias entéricas patogênicas. Embora o uso de coliformes fecais como indicador de poluição sanitária seja mais significativo que o uso de coliformes totais, por serem restritos ao trato intestinal de animais *endotérmicos*, a utilização das bactérias desse último grupo é muito importante como indicadores de condições higiênicas. Uma alta contagem desses micro-organismos no alimento significa, principalmente, contaminação durante a produção, limpeza e sanificação deficientes, ou até mesmo multiplicação durante o processamento ou estocagem (CARDOSO *et al.*, 2000).

Portanto, a propriedade 1 e a propriedade 2 apresentam água imprópria para a irrigação de hortaliças, de acordo com a resolução N° 357 (17/03/2005) do CONAMA, 2005. Os resultados obtidos apresentam-se bastante elevados sugerindo condições higiênicas deficientes.

Os resultados foram apresentados para os produtores através de laudos com os Números Mais Prováveis de cada análise (FIGURA 1- APÊNDICES).

Visto que o CONAMA (1986) estabelece o limite de tolerância zero para coliformes fecais em água de irrigação de hortaliças consumidas cruas, as propriedades analisadas apresentaram valores acima do limite recomendado. Gonçalves *et al.* (2000), desenvolveu trabalho semelhante e constatou que, em 100% das fontes investigadas, em propriedades rurais de Agudo, RS, foram encontrados níveis de coliformes fecais bastante altos.

De acordo com Souto (2005) os valores médios de coliformes totais (CTA) e fecais (CFA), encontrados em águas de irrigação de hortaliças, evidenciam que as condições ecológicas e o manejo do sistema agrícola, adotado pelos produtores, não se mostraram adequados para o uso em uma atividade que terá seu produto consumido de forma “in natura” pelos consumidores.

4.1.1 Pesquisa de *Escherichia coli* proveniente da água de irrigação

As amostras do caldo EC (item 3.2.3) provenientes das duas propriedades, inoculadas em Ágar Teague (item 3.2.6) apresentaram crescimento de colônias condizentes com *Escherichia coli* (FIGURA 2- APÊNDICES).

Os grupos de coliformes totais e fecais colonizam o trato intestinal de animais endotérmicos, incluindo os humanos, e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos (CALCI; BURKHARDT; WATKINS, 1998).

Segundo Santos, Nogueira e Cunha (1995), a *Escherichia coli* enterotoxigênica é a causa comum de "diarréia de viajante". Ocorrem diarréias, vômitos, mas o quadro febril não se manifesta. A presença de *Escherichia coli* em um alimento pode ser avaliada sob dois significados. Inicialmente, *Escherichia coli*, por ser uma enterobactéria, uma vez detectada no alimento, indica que este tem contaminação microbiana de origem fecal e portanto está em condições higiênicas insatisfatórias. O outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *Escherichia coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e animais (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

4.1.2 Pesquisa de *Salmonella* sp e *Shigella* sp proveniente da água de irrigação

As amostras da água de irrigação das duas propriedades, inoculadas no meio seletivo Agar SS (item 3.2.9), propício para o crescimento e seletividade das bactérias *Salmonella* sp e *Shigella* sp, não apresentaram crescimento. Portanto foi excluída a possibilidade da presença destes micro-organismos.

São frequentes na literatura os relatos de presença de *Salmonella* no ambiente e ausência de coliformes (CABELLI *et al.*, 1977; MORINIGO *et al.*,

1990). No Brasil, entre outros trabalhos, Souza, Iara e Paim (1992), em águas utilizadas para dessedentação de animais em Botucatu-SP, encontraram positividade para *Salmonella* e ausência de coliformes fecais.

4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO

Os fungos, proveniente da água das duas propriedades avaliadas, pertencem à espécie *Aspergillus niger* (FIGURA 5- APÊNDICES).

4.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS DAS MÃOS DOS PRODUTORES E TESTE DA EFICIÊNCIA DO AGENTE SANIFICANTE ÁLCOOL 70%

Na propriedade 1 existe diferença significativa no número de UFC de bactérias, os quais foram muito maiores antes do uso do álcool 70%. Os fungos foram completamente eliminados após a aplicação do álcool 70% (TABELA 2- APÊNDICES).

Foi possível observar que na propriedade 2, não existe diferença significativa no número de UFC de bactérias antes e após o uso do álcool (p>0,1). Em relação aos fungos, observou-se que o número de UFC aumentou após a aplicação do álcool 70% (p>0,1). Estes dados podem ser visualizados na TABELA 1 (APÊNDICES). Estes resultados podem ter ocorrido devido a maior abertura dos poros e, conseqüente, maior exposição de bactérias e fungos, quando o *swab* foi friccionado.

4.3.1. Isolamento de fungos das mãos dos produtores

Os fungos isolados das mãos do agricultor da propriedade 1 pertencem aos gêneros *Aspergillus* sp (FIGURA 6- APÊNDICES) e *Penicillium* sp (FIGURAS 7, 8, 9, 10, 11 e 12- APÊNDICES). Enquanto que, nas mãos do agricultor da propriedade 2, foi isolado o gênero *Penicillium* sp (FIGURAS 13, 14, 15 e 16- APÊNDICES).

Aspergillus, *Penicillium* e *Fusarium* são capazes de produzir micotoxinas em alimentos e ração. Tais substâncias são responsáveis por enfermidades nos

animais e no homem (KELLER *et al.*, 2005). Mais de quatrocentas micotoxinas, conhecidas na atualidade, são produzidas por aproximadamente uma centena de fungos. As principais micotoxinas podem ser divididas em três grupos: as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*; as ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*; e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (DILKIN, 2002).

Espécies de *Aspergillus* infectam o homem causando aspergilose, doença fúngica que pode se manifestar como um quadro clínico broncopulmonar alérgico: pneumonite por hipersensibilidade. Em imunodeprimidos, como aspergilose invasiva com quadro sistêmico, comprometendo o trato aéreo superior, meninges, cérebro, coração (miocárdio e endocárdio), ossos e fígado (ARIKAN, *et al.*, 1998; DENNING, 1998; LEÃO, 2006).

4.3.2 Isolamento de bactérias das mãos dos produtores

4.3.2.1. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Dentre as amostras provenientes das mãos dos produtores, das duas propriedades, a propriedade 1 apresentou crescimento de colônias no Ágar Manitol (item 3.2.8), condizente com a bactéria *Staphylococcus aureus* (FIGURA 3- APÊNDICES).

As colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, que apresentaram crescimento no meio Ágar Manitol (3.2.8) e que, posteriormente, foram inoculadas no meio Ágar Baird Parker (item 3.2.7), apresentaram resultado positivo devido ao aparecimento de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* no meio Ágar Baird Parker (FIGURA 3- APÊNDICES).

Para confirmação foi realizada uma coloração de GRAM das colônias em questão, revelando Cocos Gram-positivos (FIGURA 4- APÊNDICES).

Um estudo desenvolvido por Raddi, Leite e Mendonça (1988) mostrou uma frequência maior de *Staphylococcus aureus* nas mãos de manipuladores de alimentos (41,7%) do que num grupo que não trabalhava com alimentos (15%) e tal fenômeno poderia estar relacionado com a umidade das mãos.

Bresolin, Dall’Stella e Fontoura (2005) verificaram, também, a qualidade do procedimento de lavagem das mãos pelos manipuladores, pela observação visual e pela pesquisa da bactéria antes e após a lavagem. O procedimento foi classificado em satisfatório, suficiente e insuficiente, tendo por base a lavagem com água e sabão propriamente dita, assim como com o emprego de um anti-séptico após a lavagem. O mais comum utilizado pelos manipuladores foi o álcool a 70%.

Almeida *et al.* (2007) observaram uma redução significativa da flora bacteriana das mãos de manipuladores de alimentos após a lavagem com água e sabão neutro seguida da aplicação de um anti-séptico à base de iodo.

Wit e Kampelmacher (1988) desenvolveram um estudo que mostra que a lavagem das mãos não influencia a população do *Staphylococcus aureus*.

A OPAS (2003) refere que as mãos devem ser lavadas com água morna e esfregadas no mínimo por 15 segundos em todo o dorso, palma e espaços interdigitais; deve ser retirado o sabão com água morna e secá-las em papel toalha branco ou com ar quente.

5. CONCLUSÕES

- ❖ Ambas as propriedades apresentam água imprópria para a irrigação de hortaliças, de acordo com a resolução N° 357 (17/03/2005) do CONAMA.
- ❖ Foi detectada a presença de coliformes fecais na água de irrigação das duas propriedades analisadas. Não foi detectada a presença das bactérias *Salmonella* sp e *Shigella* sp na água de irrigação das duas propriedades analisadas. Os fungos encontrados na água de irrigação de ambas as propriedades pertencem à espécie *Aspergillus niger*.
- ❖ Foi detectada a presença da bactéria *Staphylococcus aureus* nas mãos de um dos produtores das propriedades analisadas. Os fungos encontrados nas mãos dos produtores das duas propriedades pertencem aos gêneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp.
- ❖ O uso do álcool 70% mostrou-se eficiente para a desinfecção das mãos do produtor da propriedade 2, o que não aconteceu com o produtor da propriedade 1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.C., KUAYE, A.Y., SERRANO, A. M., ALMEIDA, P. F. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.1, 19-26, Jan/Fev.2007.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996.189 p.

ANDRADE, N. J.; DIAS, A. S.; CARELI, R. T. Elaboração e implantação de sistemas de higienização de microindústrias da região de Viçosa. In: SIMPÓSIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA UFV, 1, 2000, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2000. p. 37.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, 2001. In: BEUX, M. R. **Café - estudo da diversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A**. Curitiba - UFPR, 2004, p.128. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos).

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). Baltimore: Maryland, 1998.

ARIKAN, S., UZUN, O., CETINKAYA, Y., KOCAGOZ, S., AKOVA, M., UNAL, S. Primary cutaneous aspergillosis in human immunodeficiency virus- infected patients: Two cases and review. **Clinical Infectious Diseases** 27: 641-643, 1998.

ARRUDA, G.A., POPOLIM, W.D., FUJINO, H., LEITE, C.L., RIBEIRO, L.C. Avaliação das condições de entrega de gêneros perecíveis em unidades de alimentação e nutrição, através do método de análise de perigos em pontos críticos de controle (APPCC). **Higiene alimentar**, v. 10, n.44, p.44-48, 1996.

ATLAS, RONALD. M., **Handbook of media for environmental microbiology**. 2. ed. Washington, D.C; ASM Press Publication Date: 1999.

BARNETT, H. C., HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3ed., Minneapolis: Burgess Publications, 1987.

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

BARROS, V.R.M.; PAVIA, P.C.; PANETTA, J.C. *Salmonella spp.*: sua transmissão através dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 91, p. 15-19, mar. de 2002.

BONILHA, P. R. M. **Microrganismos indicadores de contaminação fecal e enteropatogênicos em hortaliças e suas águas de irrigação**. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1986.

BOULOS, M.E.M.S. Segurança alimentar: uma preocupação – questão de atualizar e viabilizar informação. **Nutrição em Pauta**, v.26, n.1, p. 21-23, nov.-dez. de 1999.

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

BRASIL. Portaria nº1428, de 26 de novembro de 1993. **Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos", as Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e o Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ's) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos**. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 2 de dezembro de 1993.

BRASIL. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. **Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos"**. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Poder Executivo, de 01 de agosto de 1997

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Pragas: indicações de usos válidos para a cultura do morango**. Brasília, 2008 a. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 25/10/2009.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 02 de janeiro de 2001.
Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos.
Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRESOLIN, B.M.; DALL'STELLA, J.K.; FONTOURA, S.E. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e nas mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba/Paraná/Brasil: **Estud. Biolog.**, v.27, n.59, abr./jun. 2005.

BULLERMAN, L. B., SCHROEDER, L. L., PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **J. food prot.**, v.47, n.8, p.637-646, 1984.

CABELLI, V.J. “**Indicators of Recreational Water Quality. Bacterial Indicators/ Health Hazards Associated With Water**”. American Society for Testing and Materials- ASTM, pg: 222-238, 1977.

CALCI, K.R., BURKHARDT III, W., WATKINS, W.D. Occurrence of male-specific bacteriophage in fecal and domestic animal wastes, human feces and human-associated wastewaters. **Applied and Envir Microbiol**, Oxford, v.64, n.12, p.5027-5029, dec, 1998.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I. Pesquisa de *Salmonella* sp, coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos e derivados de frango. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.67, n.1, 2000.

CARDOSO, R. C. V.; CHAVES, J. B. P.; ANDRADE, N. J.; TEIXEIRA, M. A. Avaliação da eficiência de agentes sanificantes para mãos de manipuladores de alimentos em serviços de refeição coletiva. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 41, p. 17-22, jan./fev.1996.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº20 de 18 de junho de 1986.** In: **Legislação de conservação da natureza.** 4. ed. São Paulo: FBCN/ CESP. 1986. 720p.

CONAMA - **Conselho Nacional de Meio Ambiente – MMA**, Brasília, Resolução nº 357 de 17/03/2005.

COULOMBE, R. A. **Aflotoxins** 1991. In: KANIA, C. E. **isolamento e identificação de fungos associados ao café (*coffea arabica* L.) produzido**

por sistema orgânico e convencional da variedade de lapar 59. Curitiba - UFPR (Monografia – Bacharel em Ciências Biológicas) 2004.

(CVE) Centro de Vigilância Epidemiológica: **Divisão de Doença Hídrica e Alimentar.** 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 19/ 09/ 2009.

DENNING, D.W. Invasive aspergillosis. ***Clinical Infectious Diseases*** 26: 781-803, 1998.

DIAS, M.S.C.; COSTA, H.; CANUTO, R. da S. Manejo de doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n. 236, p.64-77, 2007.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, v.64, n.2, p.187-191, 2002.

FERLA, N.J, MARCHETTI, M.M, GONÇALVES, D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp., Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. **Biota Neotrop, Campinas, v.7, n.2, 2007.**

FERNANDES, JR. F., FURLANI, F., ROBERTO, P., RIBEIRO, I.J.A., CARVALHO, C.R.L. **Produção de frutos e estolhos de morangueiro em diferentes sistemas de cultivo em ambiente protegido.** Bragantia, Campinas, v. 61, n. 1, 25-34, 2002.

FRANCO, B.G.M, LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu;1996.

FRANCO, B. D. G., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

FREITAS, L. H. **Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana.** 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. **Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production.** In: KANIA, C. E. **Isolamento e identificação de fungos associados ao café (*coffea arábica* L.) produzido por sistema orgânico e convencional da variedade de lapar 59.** Curitiba - UFPR (Monografia – Bacharel em Ciências Biológicas) 2004.

GALLO, C.; ÀVILA, R. Pesquisa de *Salmonella* spp em leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba – SP. **Ciência Agrícola**. Piracicaba, v.53, n. 1, Jan./ abr. 1996.

GARCIA, I.P. & CHIAVEGATO, L.G. 1997. Resposta funcional e reprodutiva de *Phytoseiulus macropilis* (Banks, 1905) (Acari: Phytoseiidae) a diferentes densidades de ovos de *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari:Tetranychidae). **Científica**, São Paulo, v. 25, n.1, 35-43, 1997.

GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L.; KAMEI, C.A.K. Manipuladores de alimentos: capacitar? É preciso. Regulamentar? Será preciso? **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 78/79, p. 18-22, nov./dez, 2000.

GOMES, C. A. O ; ALVARENGA, A L., B.; FREIRE-JUNIOR, M.; CENCI, S. A. **Hortaliças minimamente processadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 34 p. (Coleção Agroindústria Familiar).

GONÇALVES, C. S.; RHEINHEIMER, D. S.; KIST, J. B. P.; GASPARETO, A. Qualidade de água em propriedades rurais da microbacia hidrográfica do Arroio Lino – Nova Boêmia – Agudo–RS. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p.54–59, 2000.

GUIMARÃES, A . G; LEITE, C. C; TEIXEIRA, L. D. J; ASSIS, P. N. Detecção de *Salmonella* spp. Em alimentos e manipuladores envolvidos em surtos de infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e produção animal**, Publicação on line, v.2,n. 1, 1-4, 2001. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/598> >. Acesso em: 26/11/09.

HAZELWOOD, H. D. **Manual de higiene para manipuladores de alimentos**. São Paulo: Varela, 1994. 140 p.

HAZEN, E. L., GORDON, M. A., REED, F. C. **Laboratory identification of pathogenic fungi simplified**. 3 ed, Springfield (USA), 1973.

HERRERA, T., ULLOA, M. **El reino de los hongos**. Micología básica y aplicada. 1 ed, México, 1990.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. de. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 2003.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. 3 ed.. Zaragoza: Acribia S. A.1994.

KELLER, K. M. et al. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de rações destinadas à alimentação de eqüinos no estado do Rio de Janeiro. Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida. **Seropédica**, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, Jan.-Jun., p.93-96, 2005.

KERN, M. E., BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas**. 2 ed, São Paulo: Editoral Premier, 1999.

KERN, M. E. **Medical mycology: A self- instructional text**. 3 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1988.

KLICH, M. A., PITT, J. I. **Common Aspergillus Species and their Teleomorphs**. Austrália: Commonwealth Scientific and Industrial research Organization, p.116, 1988.

KONEMAN, E. W., ROBERTS, G. D. **Micologia prática de laboratório**. Buenos Aires: Editoral Médica Panamericana, 2001.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: A guide to identification**. 2 ed. New York: Elsevier, 1987.

LEÃO, R.C., MARCHIORI, E., RODRIGUES, R., SOUZA, A., GASPARETTO, E., ESCUISSATO, D. **Tomografia computadorizada na avaliação da aspergilose pulmonar angioinvasiva em pacientes com leucemia aguda** *Radiol Bras* **39**: 327-331, 2006.

LI, S.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D. Immunochemical detection of molds: a review. **J Food Prot** 2000;63:281-91.

LIVERA, A.V.S.; SANTOS, A.C.O.; MELO, E.A.; REGO, J.C.; GUERRA, N.B. Condições higiênico-sanitárias de segmentos da cadeia alimentar de Pernambuco. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 42, p. 51-56, 1996.

MALLMANN, W. L., DARBY, C. W. Uses of a lauryl sulphate tryptose broth for the detection of coliform organisms. **American Journal of Public Health Association**, 31,127-134, 1941.

MALLOZZI, A. B., CORRÊA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Bol. Técn. Inst. Biol.**, São Paulo, n.12, p.5-26, 1998.

MENEZES, M., OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Pernambuco: UFRPE (imprensa Universitária), 1993.

MEYER T, MOREIRA AS, PIAZETTA LS. **Importância da higiene pessoal no manipulador de alimentos**. Disponível em: <http://www.unibem.br/cursos/nutricao/Kath/16.doc>. Acesso em: 25/09/2009.

MICHELOTTI, A.C.P. **Avaliação do sistema de controle de qualidade utilizado na elaboração de alimentos destinados a pacientes transplantados de medula óssea**. Dissertação (mestrado), 2002.
MORINIGO, M.A; CÓRNAX, R; MUNOZ, M.A; ROMERO, P; BORREGO, J, J. **Relationships between *Salmonella* spp and indicator microorganisms in polluted natural waters**. In: **Water Research**, v. 24, n.1, 117-20, 1990.

NGUYENTHE, C.; CARLIN, F. Microbiology of minimally processed fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 371-401,1994.

Orlandi, P.A., Chu, M.T., Bier, J.W., Jackson, J.G. Parasites and the food supply. *Foodtechnology* 2002; 56: 72-81.

OPAS; SPV; INPPAZ. **HACCP:Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos**. 2003.

PADOVANI, M. I. **Morango**: o delicado e saboroso fruto da integração dos povos. São Paulo: Ícone, 1991. 68p. (Coleção Brasil Agrícola).

PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas- SP no período de 1987 a 1993. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 77-82, 1996a.

PASSOS M.H.C.R., KUAYE, A.Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus* importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 22, n.3, Set/ Dez. 2002.

RADDI, M.S.G., LEITE, C.Q.F., MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Rev Saúde Pública**, v. 22, n.1, 36-40. 1998

RONQUE, E.R.V. **A situação da cultura do morango no Paraná**. In: DUARTE, J.F.; CANÇADO, G.M.A.; REGINA, M.A.; ANTUNES, L.E.C. ; FADINI, M.A.M. (Eds.). 1999.

SALUSTIANO, V. C.; BRABES, K. C. S.; ANDRADE, N. J. Ar de ambientes de processamento de um abatedouro: avaliação e controle por agentes químicos sanificantes. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 25, n. 293, p. 154-152, 2001.

SANTOS, F.A., NOGUEIRA, N.A.P., CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo "coalho" comercializado em Fortaleza - Ceará. **B CEPPA**. Curitiba, v.13, n.1, p.31-36, jan.-jun, 1995.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 19-22.

SILVA, F; AZEVEDO, C. A. V. **New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software**. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais...** Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

SILVA Jr., E.A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 360p.

SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2, 2004, Pelotas, RS. **Palestras do II Simpósio Nacional do Morango ; I Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul**, Pelotas: Editores Maria do Carmo Bassols Raseir, et al.2004.

SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 3, 2006, Pelotas, RS). **Resumos / III Simpósio Nacional do Morango e II Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do MERCOSUL**, Pelotas: Editores: Luis Eduardo Corrêa Antunes, Maria do Carmo Bassols Raseira, José Francisco Martins Pereira. 2007.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). Brasília, Embrapa-SPI, Rio de Janeiro, Embrapa-CTAA, 159 p., 1995.

SMITH, J. E., HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, p.816-841, 1991.

SOUSA, A.A.; SALLES, R.K.; MORMELLO, P. Identificação de pontos críticos em uma unidade de alimentação e nutrição hospitalar: subsídios para implantação do HACCP. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 84, p. 25-43, maio. 2001.

SOUTO, R. A.: **Avaliação sanitária das águas de irrigação e alfaces (*Lactuca sativa L.*) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.

SOUZA, L.C.; IARIA, S.T.; PAIM, G.V. *Salmonellas* e coliformes fecais em águas de bebida para animais. **Rev. Saúde pública**, S. Paulo, v.26, n. 5, 321-327, 1992.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F.; SPECK, M. L. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: APHA, 1992.cap. 3, p. 51-74.

SWEENWEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 141-158, 1998.

TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; SAKUMA, H. Produtos de confeitaria salgados: avaliação microbiológica e físico-química. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 1, p. 26-32, 1996.

THUNBERG, R. TRAN, T.T., BENNETT, R.W., MATTHEWS, R.N., BELAY, N. Microbial Evaluation of Selected Fresh Produce Obtained at Retail Markets. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 677-682, 2002.

TORTORA, G., FUNKE, B., CASE, C. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, p.872, 2005.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compedium for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington : American Public Health Association, 1992, 1219p.

VANETTI, M. C. D. Segurança microbiológica em produtos minimamente processados. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MINIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 3., 2004, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004. p. 30-32.

VAROQUAUX, P.; WILEY, R.C. Cambios biológicos y bioquímicos en frutas y hortalizas refrigeradas minimamente procesadas. In: WILEY, R.C. **Frutas y hortalizas minimamente procesadas y refrigeradas**. Zaragoza: Acribia, 1997.

WATADA, A.E.; KO, N.P.; MINOTT, D.A. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. **Postharvest Biology and Technology**, Berkeley, v. 9, p. 115-125, 1996.

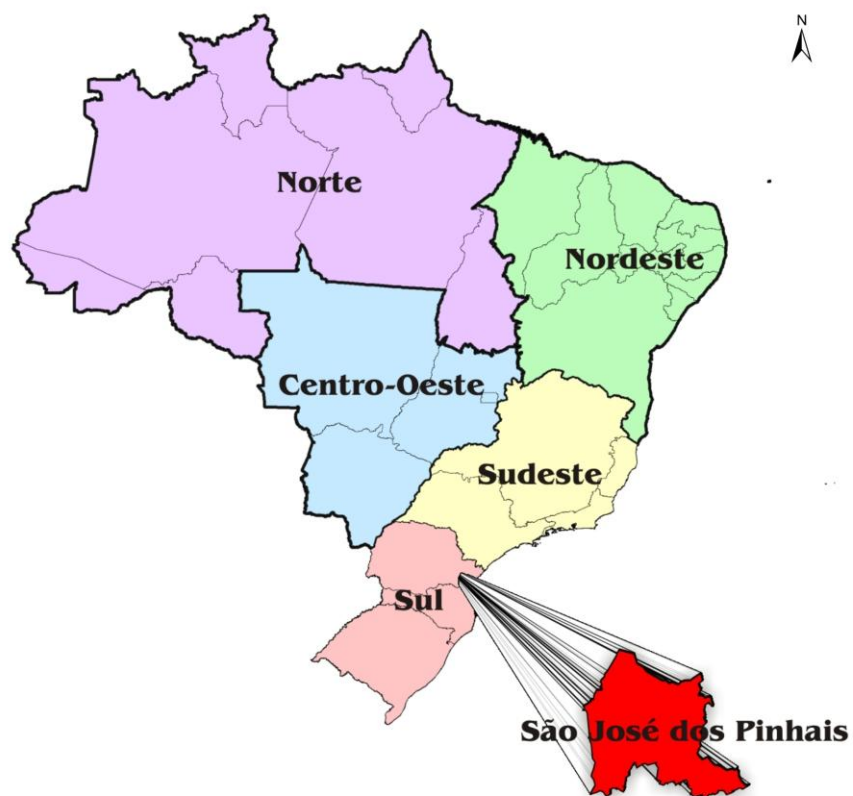
WATSON, D. H. **Natural toxicants in food**. Chichester: Ellis Horwood, p.232-247, 1987.

WILLIAMS, M. D; WILKINS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th ed., Baltimore; 1994.

WIT, J.C.; KAMPELMACHER, E.H. Some aspects of bacterial contaminatin of hands of workers in food service establishments. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg** 1988; 186(1): 45-54.

APÊNDICES

MAPA 1– MAPA DO BRASIL INDICANDO O MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.



Fonte: Secretaria Municipal de Planejamento e Desenvolvimento Econômico – PMSJP – Julho/2005.

TABELA 1 – MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DAS MÃOS DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1 ANTES E APÓS O USO DO ÁLCOOL 70%.

Propriedade 1			
Bactérias		Fungos	
UFC antes do uso do álcool	UFC depois do uso do álcool	UFC antes do uso do álcool	UFC depois do uso do álcool
3,4473	1,9445	0,90309	0
3,2044	1,8976	2,2855	0
3,3804	1,7324	1,7853	0
3,4473	1,5910	0,7781	0
3,4473	0,9542	2,2576	0
3,3804	1,2304	1,2304	0
3,1634	1,5185	2,3820	0
3,2555	2,0334	2,0530	0
3,2555	1,9822	1,5314	0
3,3012	2,1238	0,30103	0

Dados transformados para $\log(x+1)$.

Fonte: O autor.

TABELA 2 - MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DAS MÃOS DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2 ANTES E APÓS O USO DO ÁLCOOL 70%.

Propriedade 2			
Bactérias		Fungos	
UFC antes do uso do álcool	UFC depois do uso do álcool	UFC antes do uso do álcool	UFC depois do uso do álcool
2,9036	2,7201	1,6902	1,4471
2,5763	2,5065	0,7781	1,5185
2,8382	2,6117	2,0863	2,2330
2,7641	2,6963	0,4771	0,6020
2,5276	2,6283	0	1,3424
2,9036	2,6600	0	0,9030
2,7902	2,4361	0	1,2787
2,6444	2,4166	0	0,9030
2,9036	2,6364	0,3010	1,5797
0,6989	2,6283	0	2,3673

Dados transformados para $\log(x+1)$.

Fonte: O autor.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA**TESTE DE AGENTE SANIFICANTE – ÁLCOOL 70%****BACTÉRIAS**

Propriedade 1

Análise de variância (ANOVA).

Experimento Inteiramente Casualizado.

Tratamentos:

1. UFC antes do tratamento com álcool
2. UFC depois do tratamento com álcool

Repetições: 10

Dados transformados para $\log(x+1)$ **QUADRO DE ANÁLISE**

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	13.24297	13.24297	**
Resíduo	18	1.39371	0.07743	
Total	19	14.63668	171.0354	ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)ns não significativo ($p \geq .05$)GL: 1, 18 F-krit(1%) = 8.2854 F = 171.0354 $p < .00100$ **MÉDIAS E MEDIDAS**

Médias de tratamento

1	3.32828 a
2	1.70083 b

DMS = 0.26134

MG = 2.51456

CV% = 11.06595

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Propriedade 2

Análise de variância (ANOVA).

Experimento Inteiramente Casualizado.

Tratamentos:

1. UFC antes do tratamento com álcool
2. UFC depois do tratamento com álcool

Repetições: 10

Dados transformados para $\log(x+1)$

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	0.00760	0.00760	
Resíduo	18	4.09710	0.22762	
Total	19	4.10471	0.0334 ns	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 18 F-krit(5%) = .001 F = .0334 p > .10000

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	2.55508 a
2	2.59408 a

DMS = 0.44808

MG = 2.57458

CV% = 18.53086

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FUNGOS

Propriedade 1

Análise de variância (ANOVA)

Experimento Inteiramente Casualizado

Tratamentos:

1. UFC antes do tratamento com álcool
2. UFC depois do tratamento com álcool

Repetições: 10

Dados transformados para $\log(x+1)$

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	12.02475	12.02475	
Resíduo	18	4.71928	0.26218	
Total	19	16.74403	45.8641 **	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 18 F-krit(1%) = 8.2854 F = 45.8641 $p < .00100$

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	1.55079 a
2	0.00000 b

DMS = 0.48090

MG = 0.77540

CV% = 66.03569

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Propriedade 2

Análise de variância (ANOVA).

Experimento Inteiramente Casualizado.

Tratamentos:

1. UFC antes do tratamento com álcool
2. UFC depois do tratamento com álcool

Repetições: 10

Dados transformados para $\log(x+1)$

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	3.90949	3.90949	
Resíduo	18	8.11342	0.45075	
Total	19	12.02291	8.6734 **	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 18 F-krit(1%) = 8.2854 F = 8.6734 p = .00866

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	0.53329 b
2	1.41754 a

DMS = 0.63055

MG = 0.97542

CV% = 68.82978

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

FIGURA 1- EXEMPLO DE LAUDO DA ANÁLISE DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO CEDIDO PARA OS PRODUTORES DAS PROPRIEDADES 1 E 2.



Curitiba, 15 de setembro de 2008.

Análise colimétrica da água de irrigação

Data da coleta: 30/06/2008

Local: Propriedade 1 e 2, São José dos Pinhais.

Método: NMP, de acordo com o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2005).

Resultados

Água do reservatório

Coliformes totais – $1,6 \times 10^3$ NMP/100 mL (1600 coliformes totais em 100 mL de amostra)

Contagem de *E. coli* – $1,6 \times 10^3$ NMP/100 mL (1600 coliformes fecais em 100 mL de amostra)

O grupo Coliforme compreende bactérias da família Enterobacteriaceae, bacilos gram-negativos, não produtores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. São descritas aproximadamente 20 espécies, as quais podem ser encontradas no trato intestinal de humanos e outros animais endotérmicos. Os coliformes totais compreendem os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Escherichia coli*. Os coliformes fecais são representados principalmente pela *E. coli*, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$, sendo também denominada coliforme termotolerante. Esta espécie bacteriana é o principal indicador de contaminação fecal, uma vez que o seu habitat exclusivo é o intestino de animais endotérmicos. Embora estas bactérias raramente causem patologias nos seres humanos, outras bactérias que habitam o intestino podem sim, ser responsáveis por graves doenças, como *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, entre outras, daí sua importância como indicadoras de contaminação fecal.

Segundo a legislação da ANVISA, Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, os resultados devem seguir a tabela abaixo:

Tabela 1 Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano

PARÂMETRO	VMP
Água para consumo humano	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100ml
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100ml
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100ml

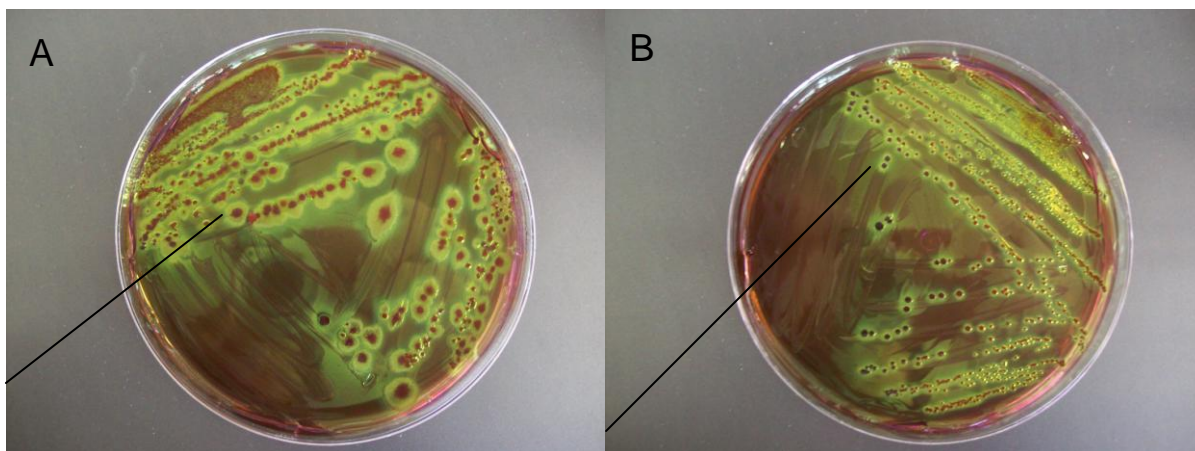
Segundo o CONAMA, Resolução 20/86, as águas para irrigação de plantas com frutos consumidos crus não deve ter mais de 1000 coliformes totais por 100 ml de amostra. Os coliformes fecais não podem ultrapassar 200 coliformes fecais por mL de amostra.

A água de irrigação analisada encontra-se fora dos padrões exigidos pela ANVISA e pelo CONAMA.

Conforme observado, o reservatório de água para irrigação da propriedade encontra-se muito próximo ao local onde diversos animais são mantidos, o que provavelmente contribuiu para a contaminação. Uma alternativa para a melhoria das condições da água,

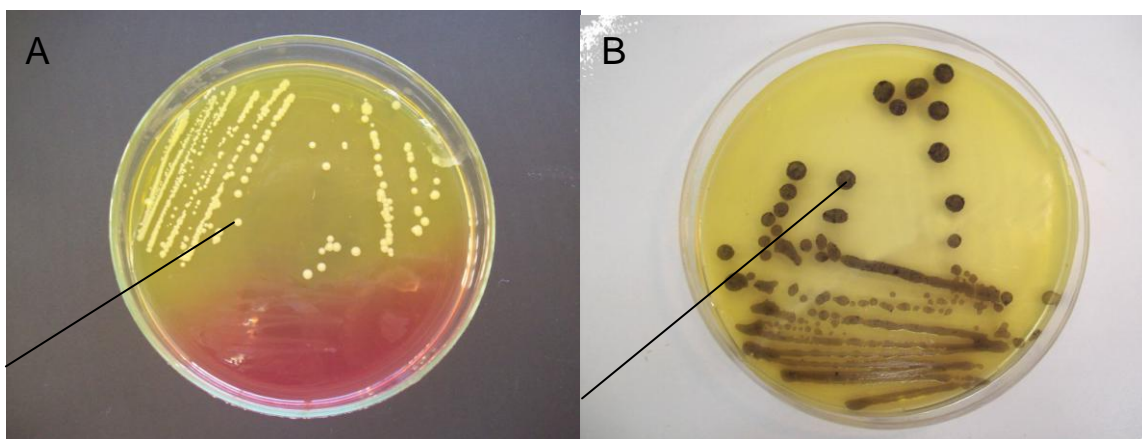
Fonte: O autor

FIGURA 2- *Escherichia coli* EM MEIO ÁGAR TEAGUE ISOLADA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO. A) PROPRIEDADE 1; B) PROPRIEDADE 2.



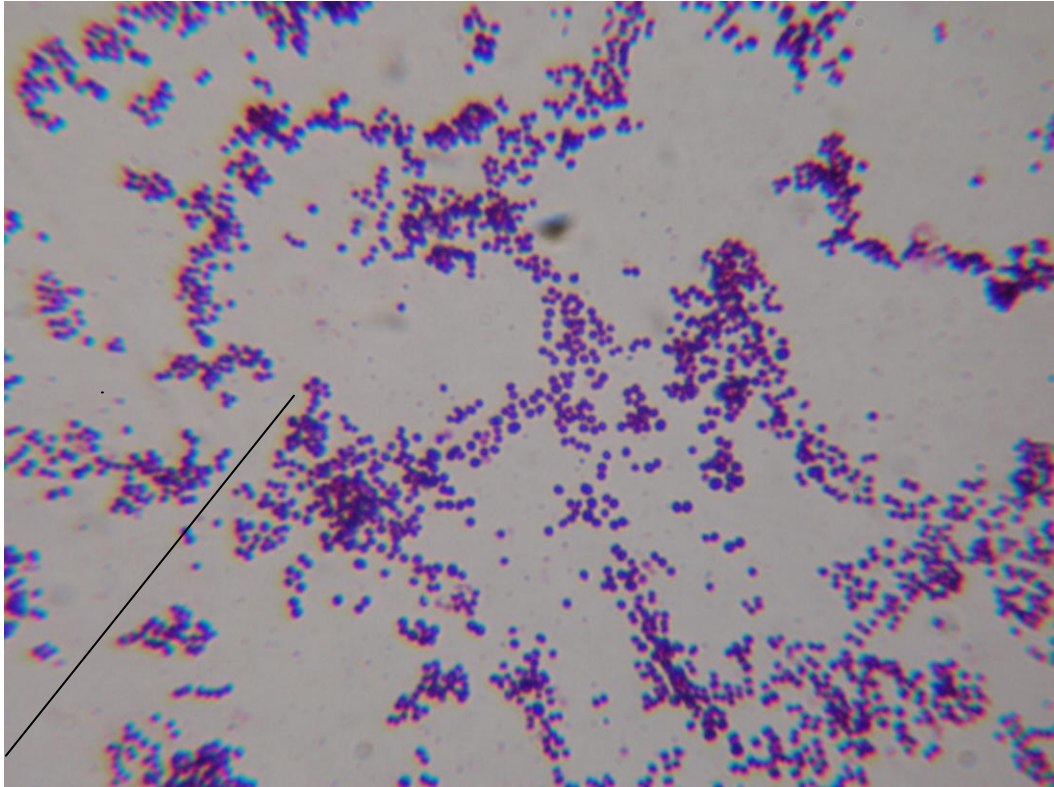
Fonte: O autor.

FIGURA 3- *Staphylococcus aureus* ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1. A) MEIO ÁGAR MANITOL B) MEIO ÁGAR BAIRD PARKER.



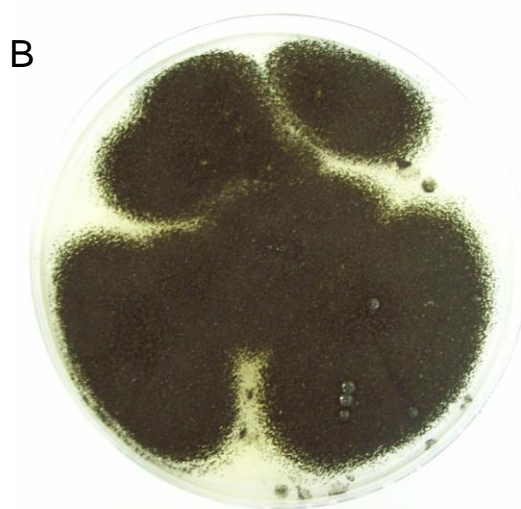
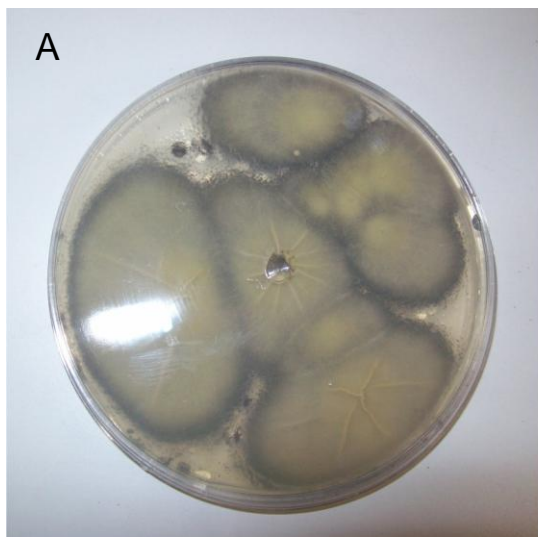
Fonte: O autor.

FIGURA 4- MICROMORFOLOGIA DE *Staphylococcus aureus* CORADA GRAM-POSITIVAMENTE. AUMENTO 400 x.



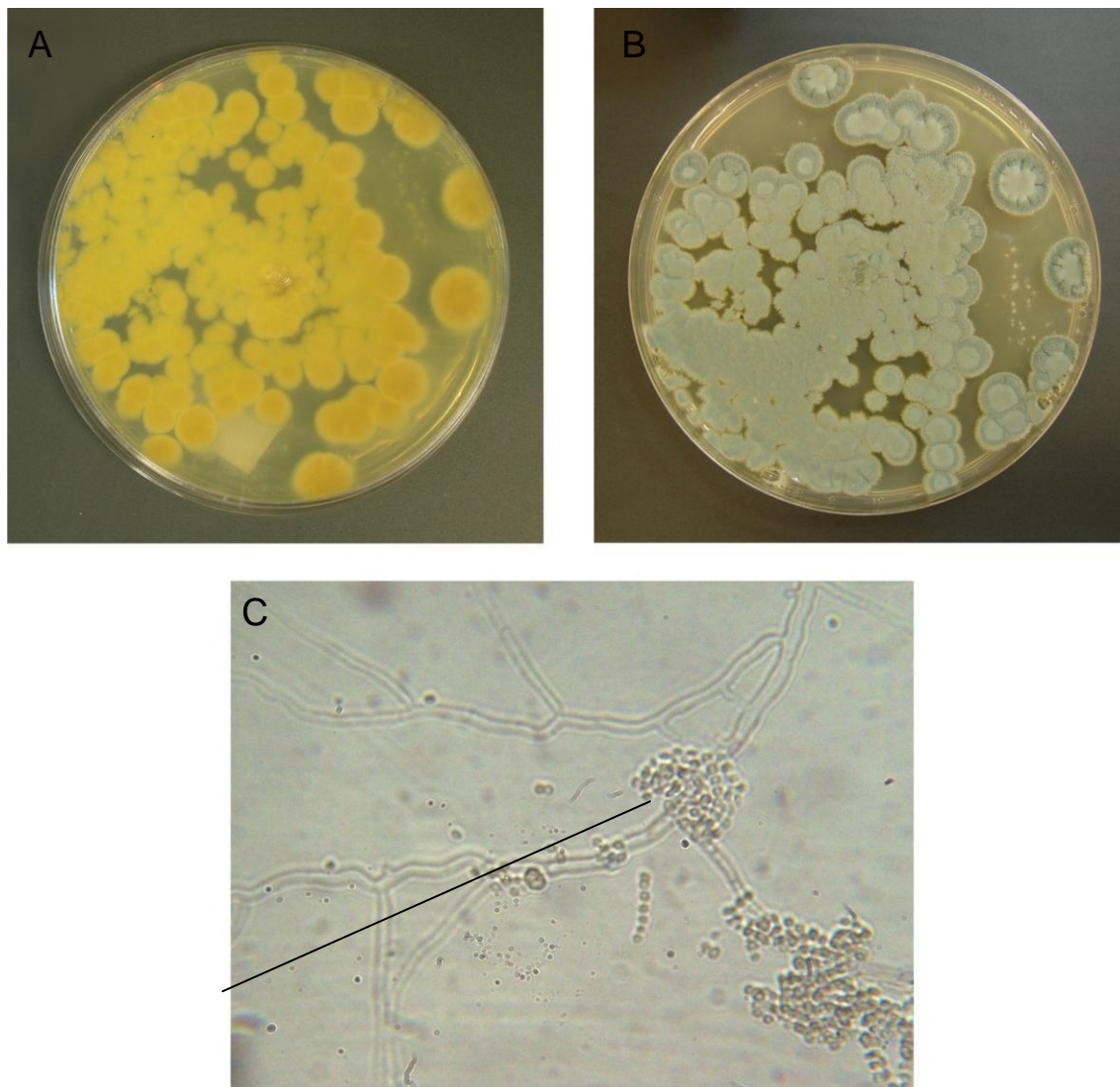
Fonte: O autor.

FIGURA 5- *Aspergillus niger* ISOLADO DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA, A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



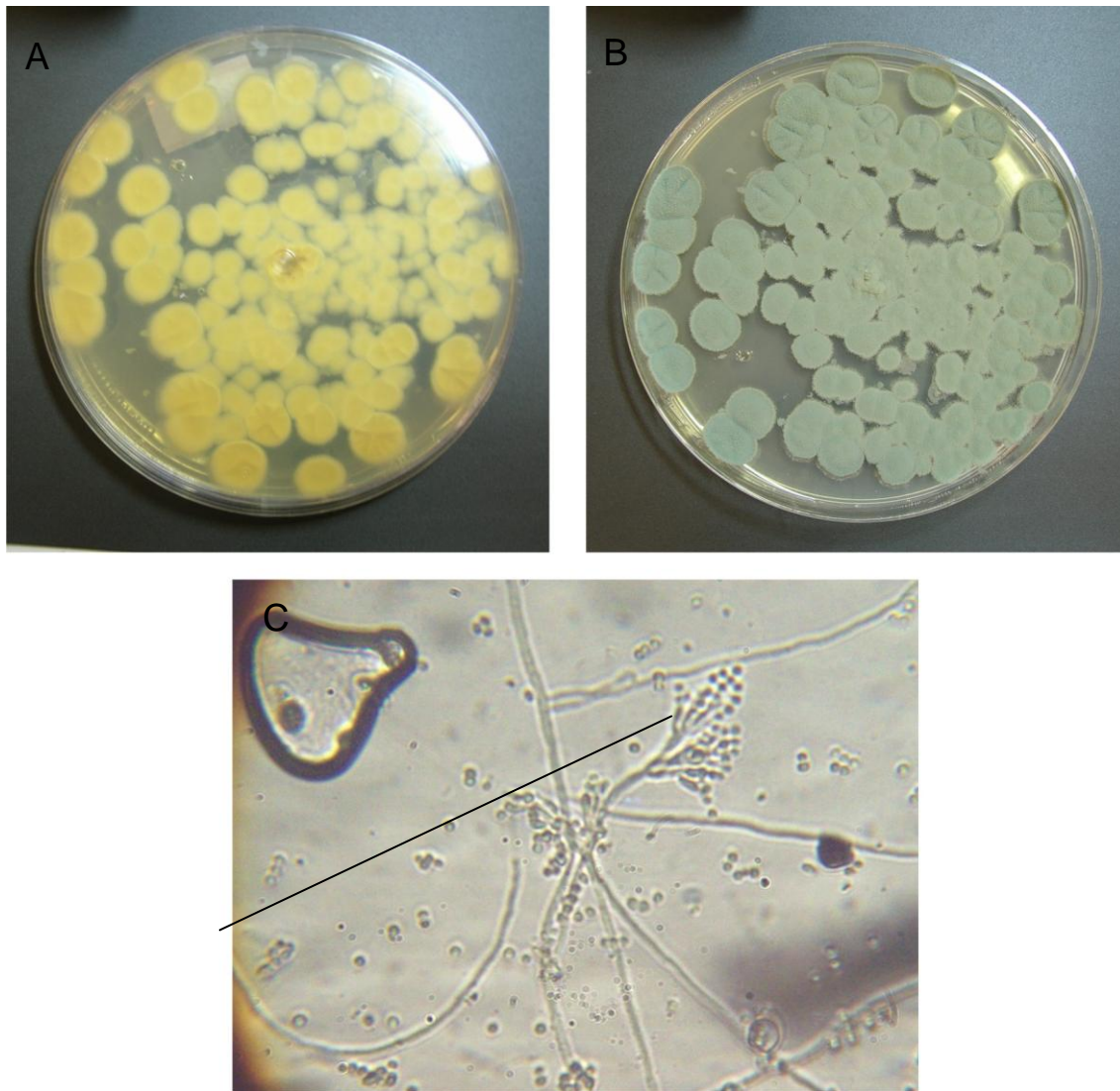
Fonte: O autor.

FIGURA 6- *Aspergillus* sp2 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA, A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



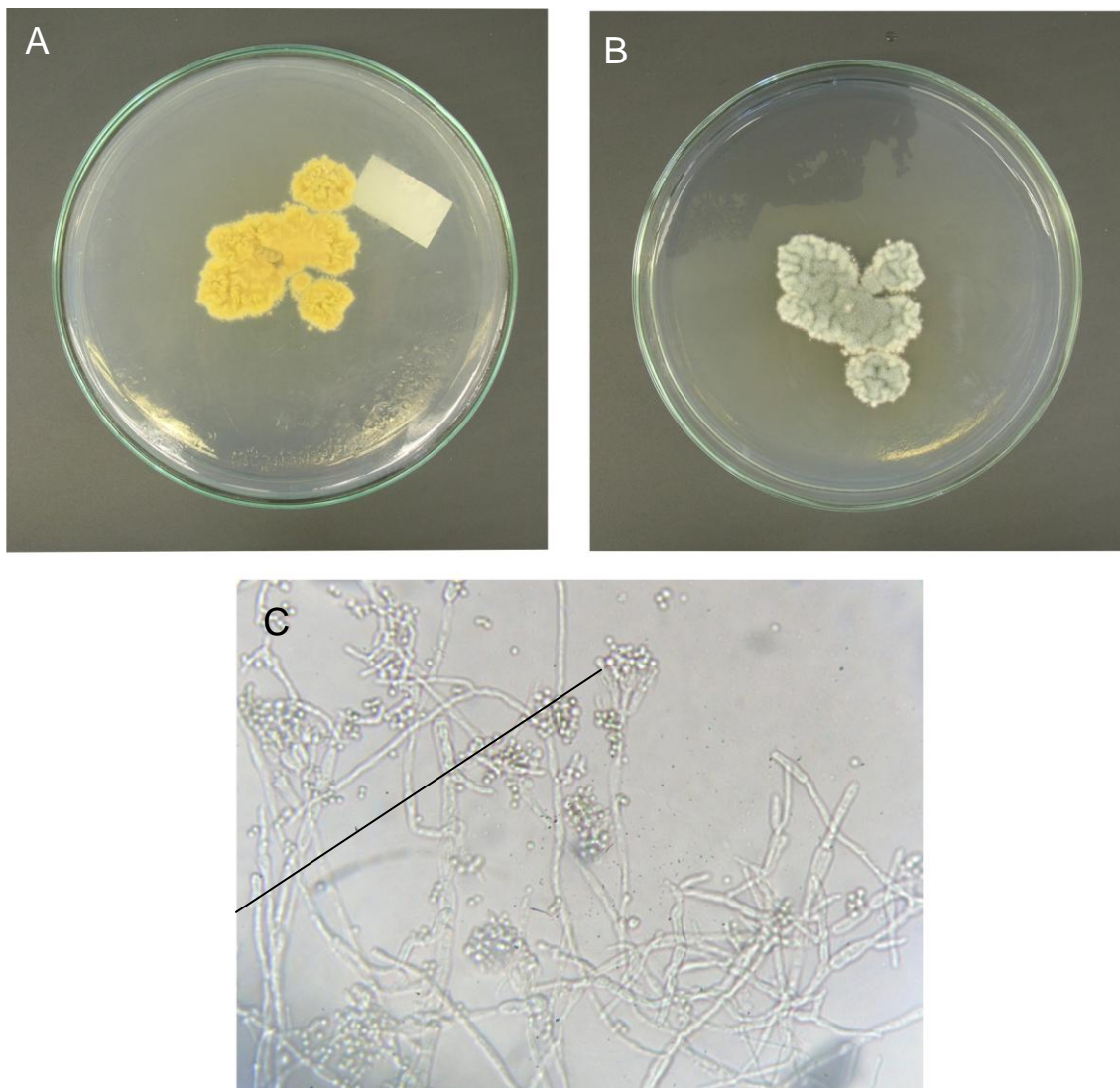
Fonte: O autor.

FIGURA 7- *Penicillium* sp1 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



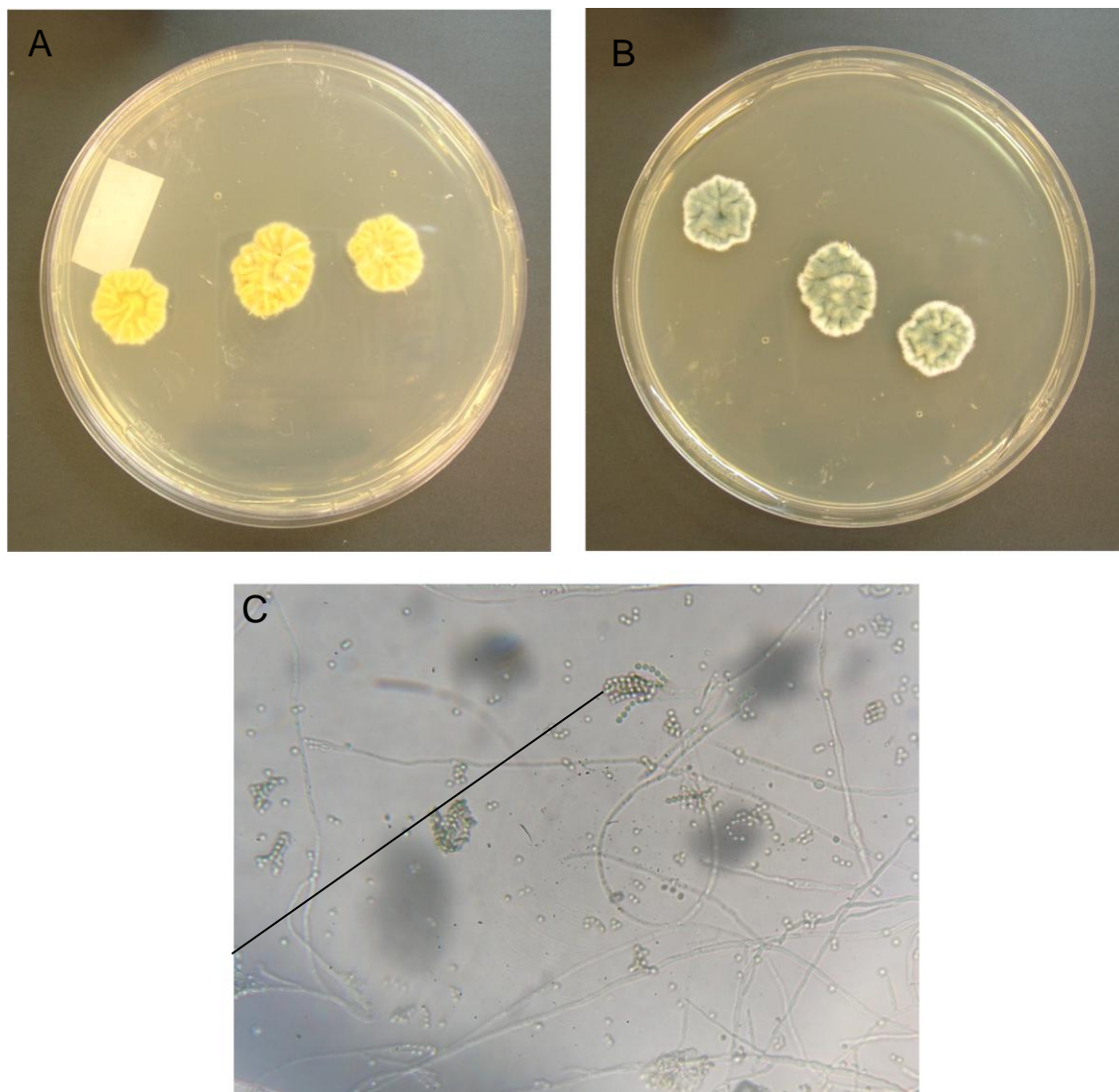
Fonte: O autor.

FIGURA 8- *Penicillium* sp2 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



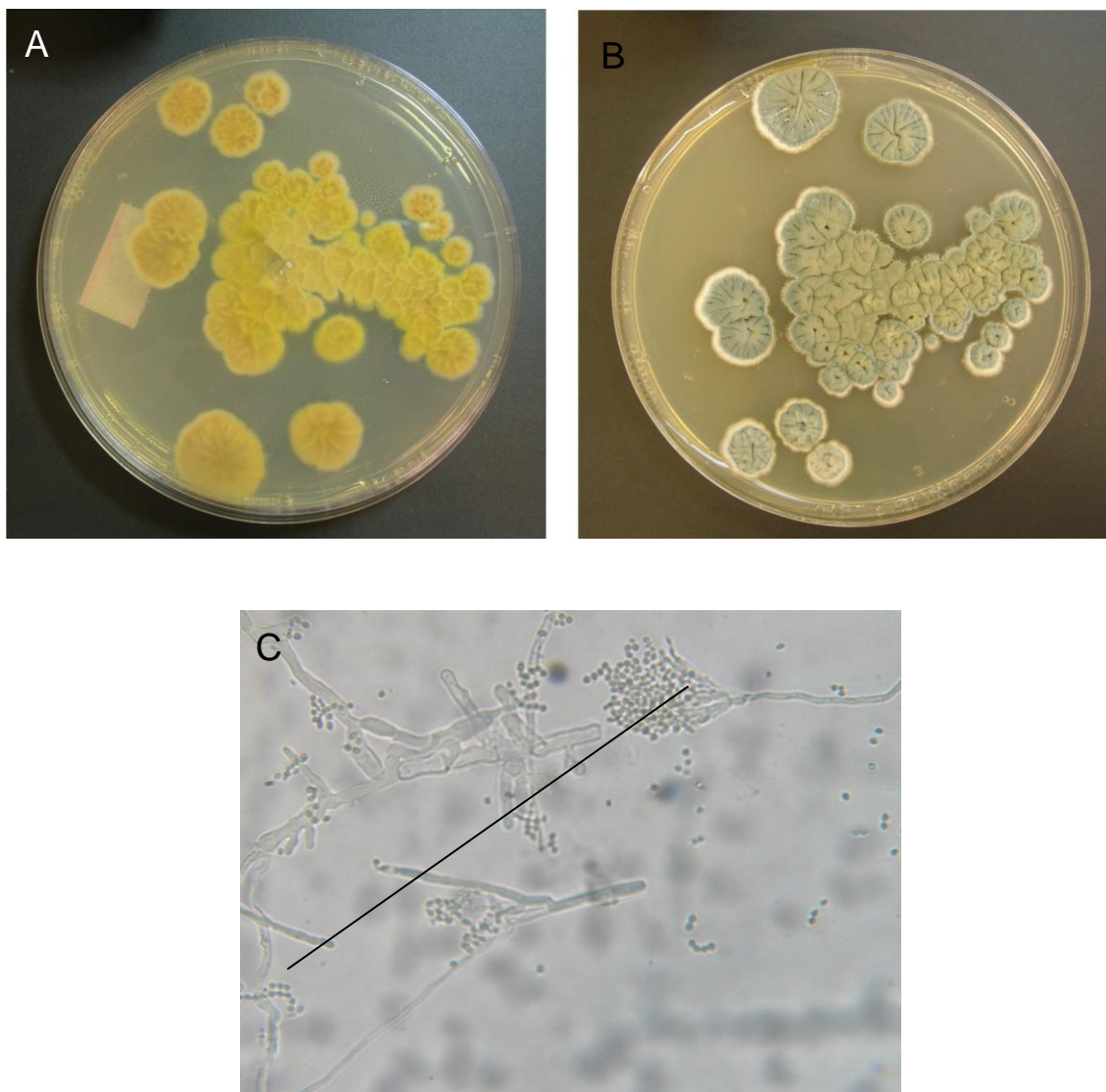
Fonte: O autor.

FIGURA 9- *Penicillium* sp3 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



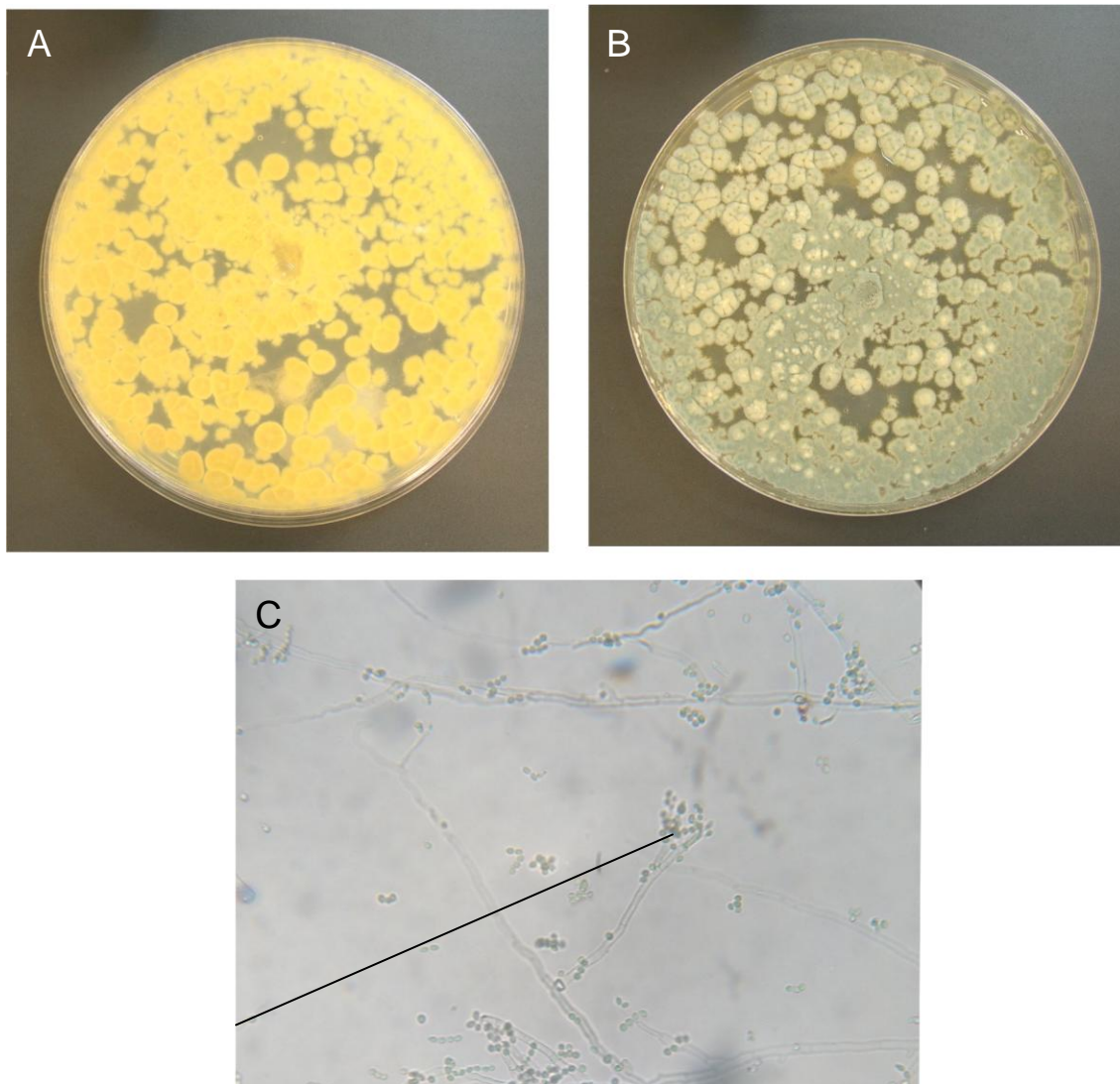
Fonte: O autor.

FIGURA 10- *Penicillium* sp4 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



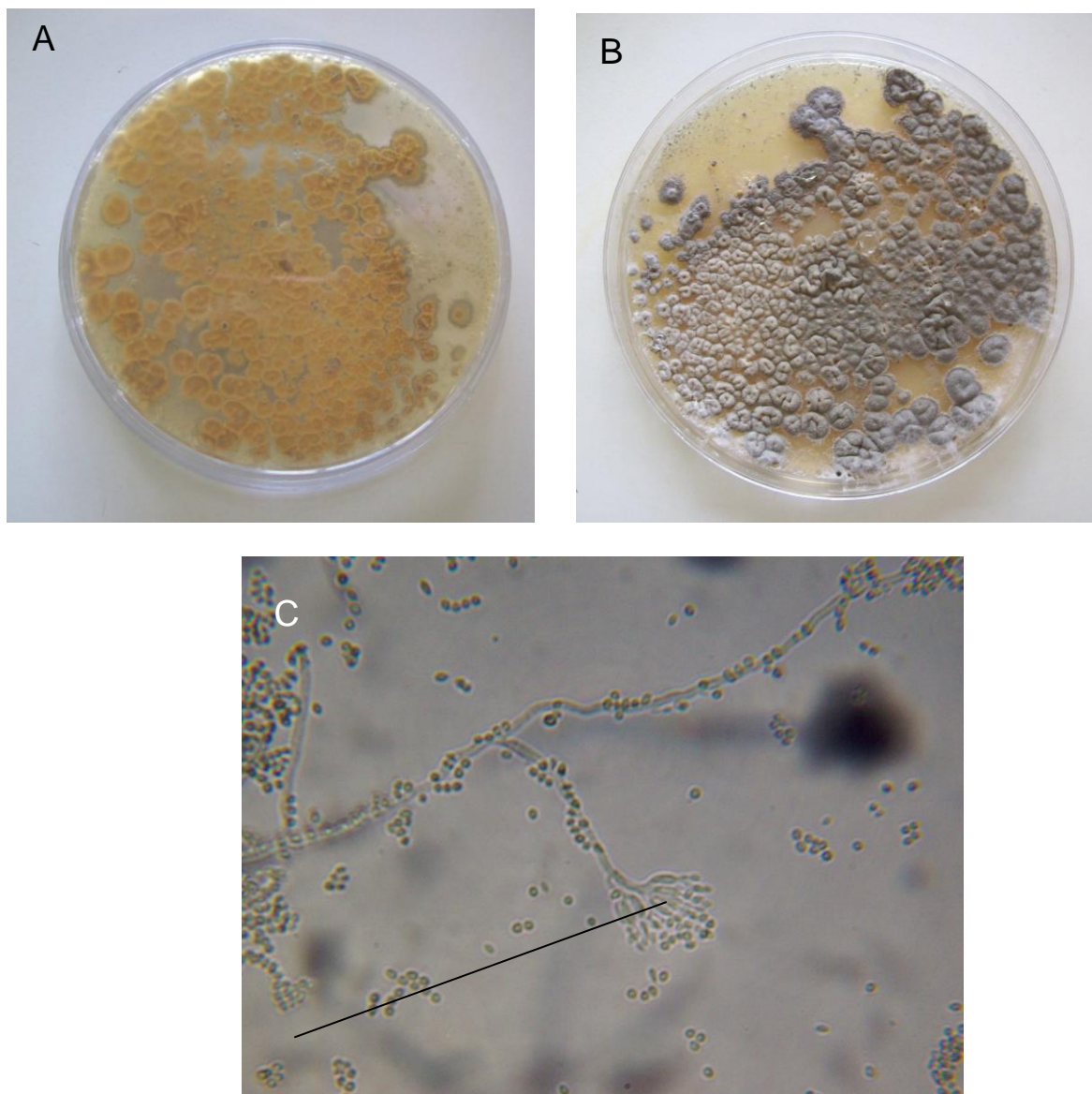
Fonte: O autor.

FIGURA 11- *Penicillium* sp5 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



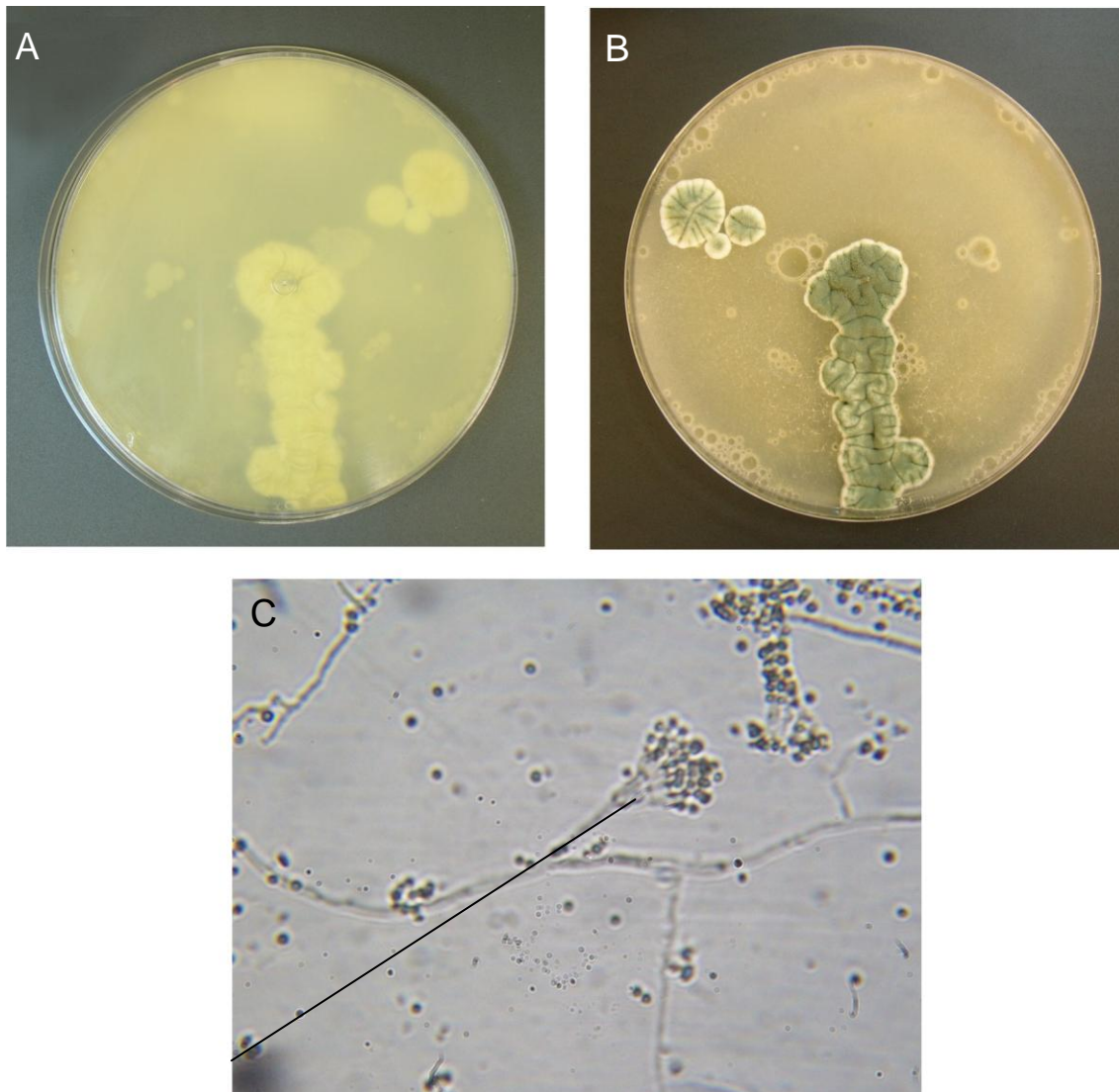
Fonte: O autor.

FIGURA 12- *Penicillium* sp6 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 1, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



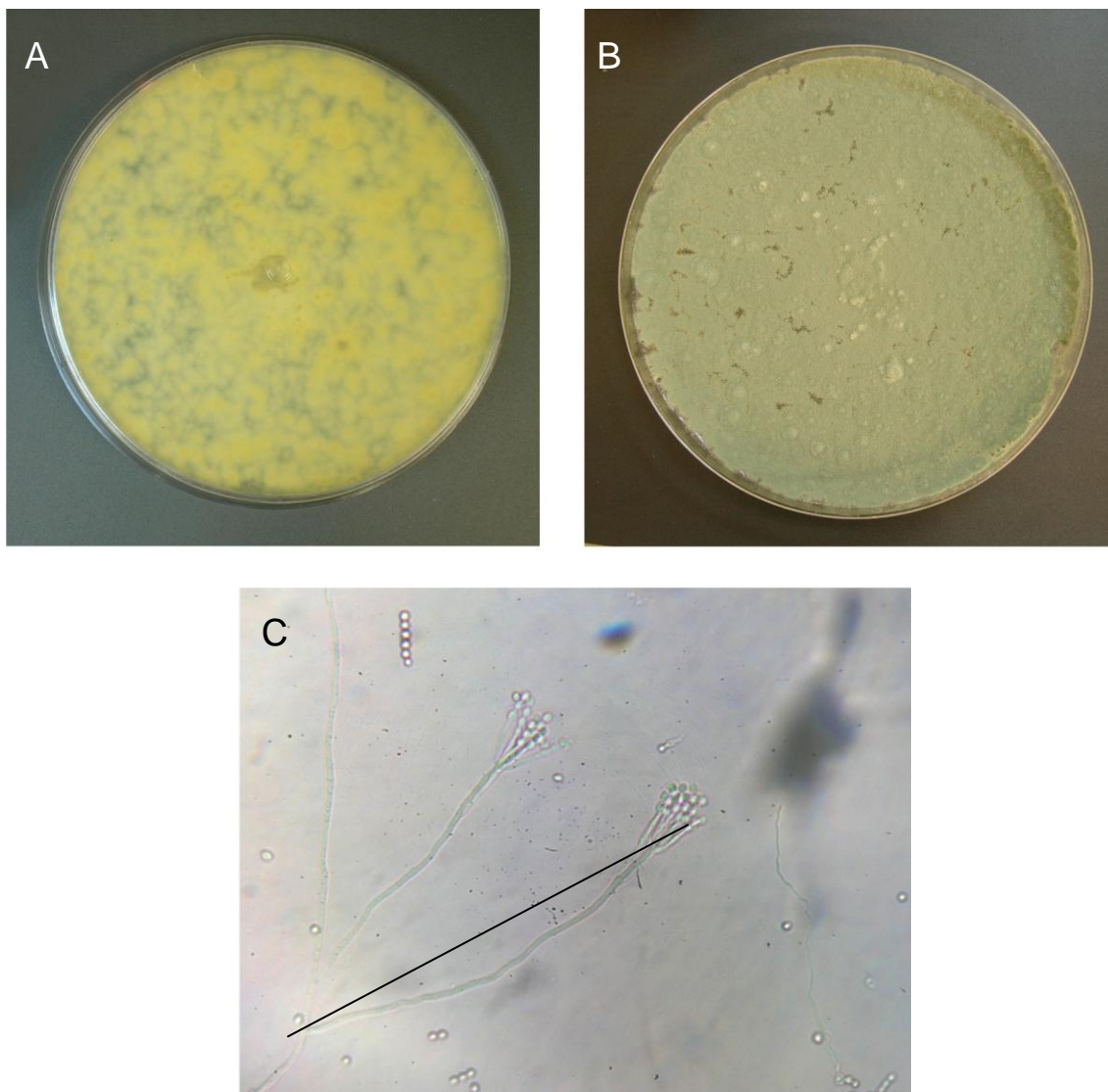
Fonte: O autor.

FIGURA 13- *Penicillium* sp7 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



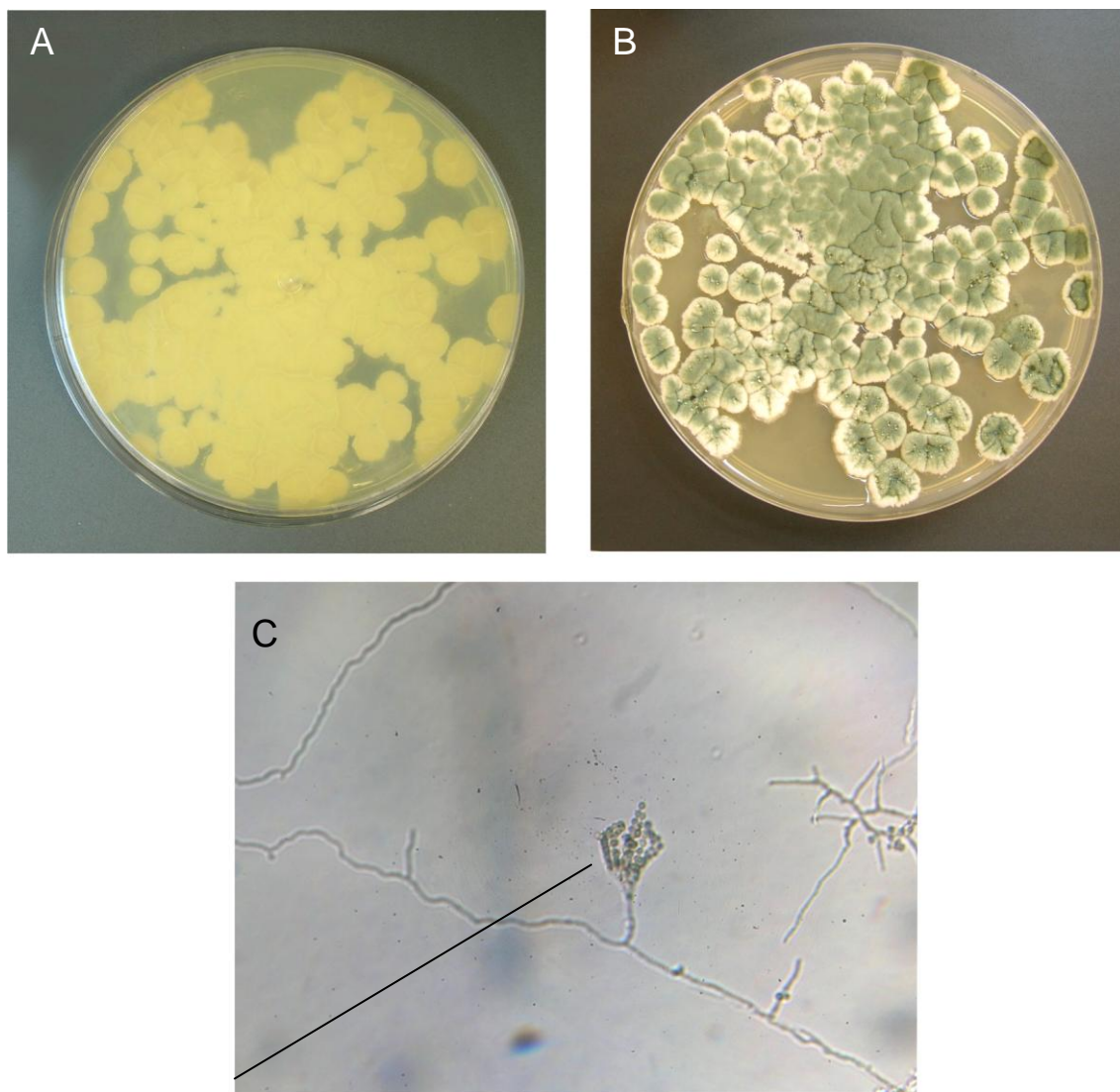
Fonte: O autor.

FIGURA 14- *Penicillium* sp8 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



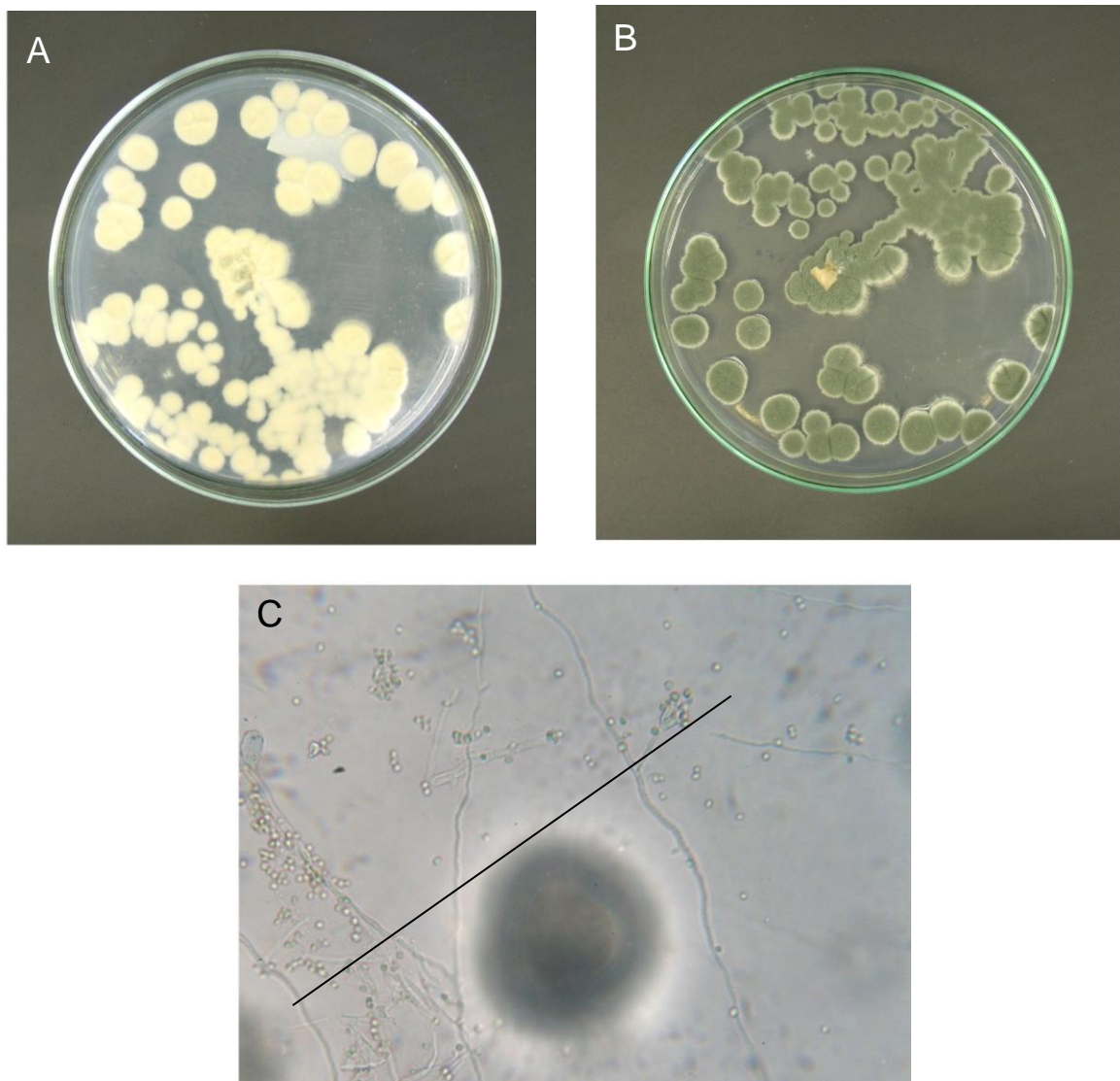
Fonte: O autor.

FIGURA 15- *Penicillium* sp9 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



Fonte: O autor.

FIGURA 16- *Penicillium* sp10 ISOLADO DA MÃO DO PRODUTOR DA PROPRIEDADE 2, EM MEIO BDA A 28°C. A- MORFOLOGIA COLONIAL- REVERSO- 7 DIAS; B) MORFOLOGIA COLONIAL- VERSO- 7 DIAS; C) MICROMORFOLOGIA- 14 DIAS. AUMENTO 400 x.



Fonte: O autor.