

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVIA TIEME MAKITA HIGUTI

EFEITO DO VINAGRE E DETERGENTE DOMÉSTICO NA REMOÇÃO
DE CISTOS DE *Giardia duodenalis* EM FOLHAS DE ALFACE CRESPA
(*Lactuca sativa*)

CURITIBA
2009

SILVIA TIEME MAKITA HIGUTI

EFEITO DO VINAGRE E DETERGENTE DOMÉSTICO NA REMOÇÃO
DE CISTOS DE *Giardia duodenalis* EM FOLHAS DE ALFACE CRESPA
(*Lactuca sativa*)

Monografia apresentada à disciplina Estágio EM em
Patologia Básica como requisito à conclusão de
Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dra. Adriana Oliveira Costa

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar e proteger nossos passos.

À professora Adriana Oliveira Costa, pela orientação, incentivo, confiança, amizade e principalmente pela paciência.

À professora Rosângela Clara Paulino, pelo apoio e conselhos na realização deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Patologia Básica, que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas, pela amizade, companheirismo e conselhos durante a elaboração deste trabalho.

Ao Laboratório Municipal de Curitiba, pelas amostras fecais cedidas para a execução deste trabalho.

À minha família, pelo apoio, incentivo, carinho, paciência e pela confiança depositada em mim.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do vinagre e do detergente doméstico na remoção de cistos de *Giardia duodenalis* em folhas de alface crespa (*Lactuca sativa*). Cistos de *Giardia* (2×10^5) purificados de fezes de humanos por técnica de gradiente de sacarose 1 M, foram inoculados na face adaxial de folhas de alface crespa cortadas com diâmetro de 11 cm. Vinte minutos após a inoculação, cada folha foi imersa em frasco contendo 200 mL de solução de vinagre (1:4), ou solução de detergente doméstico (1:20) ou água destilada para controle. Ao final de 10 e 30 minutos, cada folha foi removida, levemente agitada sobre o frasco e desprezada. Os cistos presentes na solução foram quantificados, a partir da coleta de uma amostra homogeneizada de 14 mL. A partir do valor obtido, foi estimado o total de cistos removidos da folha. Os experimentos foram repetidos três vezes e as médias referentes à remoção dos cistos foram comparadas pelo teste t de Student. Após tempo de contato de 10 minutos, a média de cistos removidos das folhas imersas em solução de vinagre, foi de $1,11 (\pm 0,42) \times 10^5$ (55,5%) e das folhas imersas em água (controle) foi de $0,87 (\pm 0,13) \times 10^5$ (43,5%). Neste tempo de contato, o número médio de cistos removidos das folhas imersas em solução de detergente foi de $1,30 (\pm 0,55) \times 10^5$ (65,5%) e nas folhas imersas em água para este experimento foi de $0,71 (\pm 0,23) \times 10^5$ (35,5%). Após 30 minutos de contato, a imersão em solução de vinagre e no controle água removeu $1,26 (\pm 0,26) \times 10^5$ cistos (63%) e $1,17 (\pm 0,33) \times 10^5$ cistos (58,5%) cistos, respectivamente. O número médio de cistos removidos após imersão em detergente e em água, neste tempo de contato, foi de $0,95 (\pm 0,15) \times 10^5$ (47,5%) e $1,66 (\pm 0,39) \times 10^5$ (83,5%), respectivamente. Não houve diferença entre as médias do número de cistos removidos nos diferentes experimentos ($p > 0,05$). Estes resultados indicaram que grande número de parasitos permaneceu nas folhas mesmo após a submersão das mesmas em solução de vinagre, ou água, não havendo diferença de remoção em relação à imersão em água. Portanto, os produtos avaliados não tiveram efeito melhor que a água para remover cistos de *Giardia* de folhas de alface.

Palavras-chave: Remoção. Vinagre. Detergentes. Verduras.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of vinegar and household detergent for removing *Giardia duodenalis* cysts from curly leaf lettuce (*Lactuca sativa*). *Giardia* cysts (2×10^5) were purified from human feces by an 1M sucrose gradient and inoculated on the adaxial side of lettuce leaf pieces (11cm in diameter). Twenty minutes after the inoculation, each piece was immersed in a flask containing 200 mL of vinegar diluted in water (1:4) or domestic detergent solution (1:20 dilution in water). The leaves were also immersed in distilled water as control. After 10 and 30 minutes, each leaf was removed, slightly shaken on the flask and discarded. A homogenized sample of 14 mL of the solutions was recovered and centrifuged to quantify the number of removed cysts. The experiments were performed three times and the statistical Student's t-test was used to compare the averages. After a contact time of 10 minutes, the number of cysts removed from the leaves immersed in a solution of vinegar was $1.11 (+ 0.42) \times 10^5$ (55.5%), and $0.87 (+ 0.13) \times 10^5$ cysts (43.5%) was removed when water was used and leaves immersed in water was. For the leaves immersed in detergent solution, the average removal after 10 minutes was $1.30 (+ 0.55) \times 10^5$ cysts (65.5%) and leaves immersed in water was $0.71 (+ 0.23) \times 10^5$ (35.5%). After 30 minutes of contact, vinegar solution promoted the removal of $1.26 (\pm 0.26) \times 10^5$ cysts (63%) , and the water used in this experiment removed $1.17 (\pm 0,33) \times 10^5$ cysts (58.5%). After this time, detergent solution removed $0.95 (+ 0.15) \times 10^5$ cysts (47.5%) while water removed $1.66 (+ 0.39) \times 10^5$ cysts (83.5%). The above removal rates were not significantly different ($p>0.05$). These results indicated that a considerable number of parasites remained in the leaves when they were immersed in vinegar or detergent solutions and that these substances were not more efficient than water to remove cysts from the lettuce leaves.

Key words: Removal. Vinegar. Detergent. Vegetables.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS ORGANISMOS RELACIONADOS AOS SURTOS DECORRENTES DA INGESTÃO DE FRUTAS E VERDURAS	12
TABELA 2 – NÚMERO DE CISTOS DE <i>Giardia duodenalis</i> REMOVIDOS DAS FOLHAS IMERSAS NOS TRATAMENTOS VINAGRE E ÁGUA	18
TABELA 3 – CISTOS RECUPERADOS DAS FOLHAS IMERSAS EM SOLUÇÃO DE DETERGENTE E ÁGUA POR 10 E 30 MINUTOS	18
TABELA 4 – VALORES DE p PARA AS COMPARAÇÕES ENTRE CADA TRATAMENTO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO PELO CÁLCULO ESTATÍSTICO t STUDENT.....	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 <i>Giardia duodenalis</i> COMO PATÓGENO ALIMENTAR	9
2.2 HORTALIÇAS E CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR.....	11
2.3 DESCONTAMINAÇÃO DE HORTALIÇAS CONSUMIDAS CRUAS	13
3. OBJETIVO	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 OBTENÇÃO DE PARASITOS.....	15
4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES DE VINAGRE E DETERGENTE.....	16
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO VINAGRE E DE DETERGENTE NA REMOÇÃO DOS PARASITOS	16
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	17
5 RESULTADOS	17
5.1 OBTENÇÃO DE CISTOS.....	17
5.2 EFEITO DO VINAGRE NA REMOÇÃO DE CISTOS DE <i>Giardia</i>	17
5.3 EFEITO DO DETERGENTE NA REMOÇÃO DE CISTOS DE <i>Giardia</i>	18
6 DISCUSSÃO	19
7 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, surtos de doenças alimentares têm sido associados à ingestão de frutas, verduras e produtos prontos para comer, ou minimamente processados, contaminados por patógenos (WARRINER *et al.*, 2009; BAERT *et al.*, 2009; HANNING *et al.*, 2009; HAVELAAR *et al.*, 2009). Dentre estes patógenos estão as bactérias, vírus e protozoários, sendo que, surtos relacionados às bactérias são mais frequentemente descritos na literatura (GERNER-SMIDT e WHICHARD, 2009). Não menos importantes, os protozoários aparecem como causadores de surtos alimentares (PONKA *et al.*, 2009; ETHELBERG *et al.*, 2009; CARDOEN *et al.*, 2009).

Para prevenir doenças causadas por patógenos contidos nos alimentos consumidos crus, como hortaliças e frutas, certos procedimentos de higienização são necessários para garantir sua qualidade. Dentre estes procedimentos, está a imersão destes alimentos em substâncias desinfetantes, como derivados clorados (SELMA *et al.*, 2007; GUENTZEL *et al.*, 2008; NEI *et al.*, 2009;), detergentes (RAIDEN *et al.*, 2003a, 2003b; SAMADI *et al.*, 2009) e ácidos orgânicos e inorgânicos (INATSU *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2009).

Devido a uma tendência crescente de uma parte dos consumidores por consumir produtos não afetados por substâncias químicas como o cloro, substâncias naturais como ácidos orgânicos têm sido uma opção para descontaminação de hortaliças (ALLENDE *et al.*, 2007). O vinagre é um ácido orgânico naturalmente encontrado em frutas, sendo assim, uma opção mais saudável comparado aos ácidos inorgânicos e a derivados clorados, que podem ser prejudiciais à saúde.

Detergentes também podem ser uma opção acessível para o usuário doméstico na desinfecção de verduras. Alguns trabalhos têm testado estas substâncias avaliando sua capacidade de inativar ou remover patógenos de hortaliças (RAIDEN *et al.*, 2003; SAMADI *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm sido realizados visando avaliar a eficiência destas substâncias como desinfetantes e o foco principal tem sido as bactérias, já que microrganismos como *Listeria*, *Salmonella* e *Escherichia coli* são as mais frequentemente encontradas contaminando hortaliças e produtos minimamente processados (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; SAMARA *et al.*, 2009). No entanto, protozoários vêm ganhando importância como possíveis contaminantes destes alimentos (DAWSON, 2005; CHAIDEZ *et al.*, 2005; MOTA *et al.*, 2009). Dentre estes, *Giardia* é um dos que oferecem mais risco na produção de alimentos (DAWSON, 2005). Apresenta em seu ciclo a forma trofozoítica e a cística sendo que esta última pode resistir por longos períodos no ambiente. Por meio da água contaminada utilizada para irrigar as hortaliças ou da utilização de fertilizantes orgânicos não tratados, estes cistos e outros patógenos podem vir

a contaminar frutas e verduras (NIKAIDO *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2009; HANNING *et al.*, 2009; MACARISIN *et al.*, 2009).

Pouco se tem descrito sobre o efeito do vinagre e do detergente sobre protozoários. Considerando que são produtos de baixo custo, acessíveis à maioria da população e que no Brasil o vinagre é utilizado popularmente para a higienização de verduras e hortaliças, este projeto tem por finalidade testar a eficiência destes produtos para remover cistos de *Giardia* de folhas de alface experimentalmente contaminadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Giardia duodenalis* COMO PATÓGENO ALIMENTAR

Giardia duodenalis (sinonímia: *G. lamblia*, *G. intestinalis*) é um protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora, segundo a classificação de LEVINE (1980) (ADAM, 1991). O protozoário flagelado foi primeiramente visualizado por Van Leeuwenhoek em 1681 em suas próprias fezes diarréicas (FORD, 2005), entretanto, a primeira descrição foi realizada por Lambl em 1859 (MARSHALL *et al.*, 1997).

Este parasita tem ganhado maior importância no âmbito de ser um potencial patógeno encontrado comumente em verduras consumidas cruas. Sua forma infectante são os cistos os quais podem ser encontrados no solo, alimentos e água ou em superfícies que foram contaminadas por fezes infectadas de humanos ou animais (MATUSZEWSKA, 2007). Os cistos são eliminados junto com as fezes do hospedeiro, sendo que indivíduos infectados por *Giardia* podem excretar acima de 2×10^6 cistos por grama de fezes (MEYER, 1990).

Outra característica que contribui para a disseminação dos parasitos no ambiente, aumentando conseqüentemente o risco de infecção humana, é a transmissão zoonótica, na qual outras espécies de animais serviriam como hospedeiros. Existem fortes suspeitas de que esse tipo de transmissão ocorra em *Giardia* (THOMPSON, 2004).

O protozoário apresenta também a forma trofozoítica, a qual é encontrada no lúmen do intestino delgado do hospedeiro e se multiplica por divisão binária (FIGURA 1). Apresenta formato piriforme e sua superfície dorsal é convexa. Os oito flagelos emergem das regiões anterior, posterior, ventral e caudal do parasita e os dois núcleos se localizam na região anterior dos trofozoítos. Os trofozoítos se transformam em cistos no próprio intestino, por um processo complexo de encistamento, que se inicia com a supressão do movimento dos trofozoítos e pela aquisição das formas arredondadas pelos mesmos (FORD, 2005).

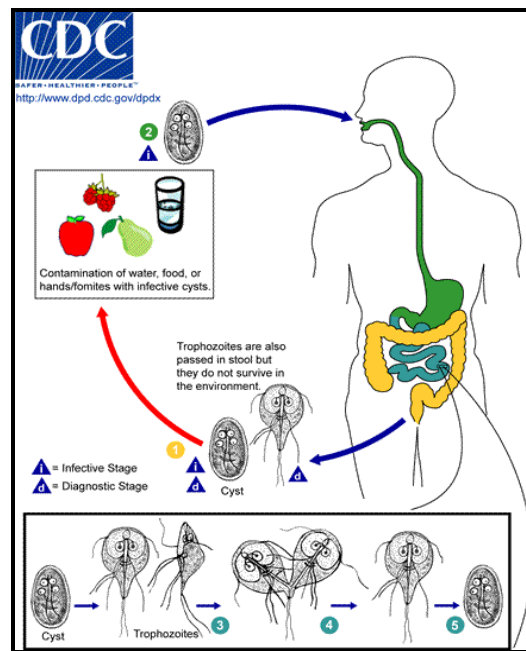


FIGURA 1 – Ciclo de vida do protozoário *Giardia duodenalis* FONTE: Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern (DPDx)

A giardíase pode ser assintomática, porém nas suas formas sintomáticas, determina mal-estar, náuseas, anorexia, febre baixa, diarreia explosiva e fétida associada à distensão abdominal e flatulência (MEYER, 1990). Estas alterações são importantes em crianças, geralmente mais afetadas, pois prejudicam o desenvolvimento destas pela deficiência nutricional e pelo atraso no desenvolvimento da função cognitiva.

Atualmente há grande preocupação com a veiculação hídrica de *Giardia* e vários países têm adotado medidas para prevenir a infecção por esta via (POZIO, 2008; ROBERTSON *et al.*, 2009; YODER *et al.*, 2008). Levando em conta a veiculação pela água, os cistos do protozoário podem atingir verduras em sua fase de produção, através de água de irrigação contaminada. Por serem resistentes às condições ambientais externas e pela baixa dose infectante, 10 a 100 cistos, se ingeridos, são suficientes para que ocorra a infecção. (OKHUYSEN *et al.*, 1999; RENDTORFF, 1954).

Robertson e Gjerde (2001) relataram que dos 475 exemplares entre frutas e verduras examinados na Noruega 2,11% (6 amostras) estavam contaminados com cistos de *Giardia*. Em Ribeirão Preto, 129 amostras de alface produzidas em hortas foram analisadas e em 26 amostras foram detectados patógenos sendo que em 13,1% das alfaces continham enteroparasitas, dentre eles *Giardia* (TAKAYANAGUI *et al.*, 2000). Amostras de espinafre (*Ipomea aquatica*) em Phnom Penh, Camboja, apresentaram incidência de 56% (20 amostras) de cistos de *Giardia* (VUONG *et al.*, 2007). Na Costa Rica, 640 amostras de oito diferentes vegetais que são ingeridos crus foram analisados e cistos de *Giardia* foram

encontrados em todas as oito variedades de vegetais (MONGE *et al.*, 1996). Em outro trabalho, Monge e Arias (1996), encontraram incidência de 5,2% (4 de 80 amostras) de *Giardia* em folhas e 2,5% (2 amostras) nas raízes de coentro. *Giardia* estava entre os protozoários que foram detectados em 50 amostras de verduras comercializadas na região metropolitana de São Paulo (DE OLIVEIRA e GERMANO, 1992). Na Noruega, quatro variedades de brotos de sementes foram analisados para a detecção de bactérias e parasitas, sendo que 2% das amostras (171 amostras no total) continham *Giardia* (ROBERTSON *et al.*, 2002). As pesquisas anteriormente descritas indicaram a ocorrência de diversos patógenos nas hortaliças não só no Brasil como também em países desenvolvidos como a Noruega, mostrando a importância da adoção de medidas preventivas contra protozoários como *Giardia duodenalis*.

Manipuladores de alimentos que não apresentem os devidos hábitos higiênicos também podem ser uma fonte de transmissão de cistos de *Giardia* (QUIROZ *et al.*, 2000; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008; GREIG *et al.*, 2007). Em 1990, um surto de giardíase acometeu 26 indivíduos que se alimentaram na cantina do escritório corporativo tendo como fonte de contaminação as verduras cruas que foram manipuladas pelo funcionário da cantina que se encontrava infectado com *Giardia* (MINTZ *et al.*, 2003). Quick *et al.*, 1992 relatou que o gelo contaminado por um funcionário do restaurante, causou um surto de giardíase em 27 das 36 pessoas de centro de formação profissional que foram fazer uma refeição no restaurante.

2.2 HORTALIÇAS E CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR

A preocupação em adquirir hábito alimentar mais saudável inclui a ingestão de frutas e verduras, sendo que, na maioria das vezes, estas são ingeridas cruas. Hortaliças minimamente processadas têm ganhado popularidade visto o mínimo preparo destas para o consumo (RAGAERT *et al.*, 2003). Produtos vegetais minimamente processados são definidos como aqueles submetidos a operações de limpeza, lavagem, seleção, descascamento, corte, embalagem e armazenamento, mas que apresentem qualidade semelhante à do produto fresco (PEREIRA *et al.*, 2004). Além das pessoas estarem se interessando por hortaliças minimamente processadas, os produtos provenientes da agricultura orgânica, na qual não há a utilização de agrotóxicos, têm ganhado maior popularidade entre os consumidores que preferem produtos não afetados por tratamentos químicos (KEIKOTLHAILE *et al.*, 2009). Entretanto, tanto os produtos provenientes da agricultura orgânica como também os produtos minimamente processados podem estar contaminados por patógenos (LEIFERT *et al.*, 2008). Na agricultura orgânica, a utilização de fertilizantes orgânicos não tratados, como adubo de origem animal ou lodo de esgoto, pode

ser um risco para a contaminação dos produtos visto que estes podem conter bactérias, cistos de protozoários e ovos de helmintos (JOHANNESSEN *et al.*, 2003; BEUCHAT, 1998).

A água utilizada na irrigação das hortaliças pode ser também uma fonte de contaminação (DRAGONE *et al.*, 2007; CHOJECKA *et al.*, 2009), pois é um dos principais veículos de transmissão de importantes patógenos. Beuchat e Ryu (1997) relataram haver uma preocupação nos Estados Unidos em relação à água contaminada utilizada na irrigação que implica em riscos à saúde das pessoas. Na cidade do México, Mazari-Hiriat *et al.* (2001), observaram que a água de irrigação de hortaliças é uma importante rota de transmissão de patógenos entéricos.

Dentre os patógenos relacionados aos surtos alimentares, as bactérias estão entre as mais citadas pela literatura. Entre 2001 e 2006, dois surtos associados à ingestão de salada contaminada por *Campylobacter* ocorreram durante a primavera na Austrália (UNICOMB *et al.*, 2009). Em 2008, 42 das 61 pessoas que participavam de uma viagem na Áustria foram acometidos por *Shigella sonnei* proveniente da ingestão de salada (KUO *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, 30 pessoas foram infectadas por *Salmonella Litchfield* por meio da ingestão de salada de frutas no restaurante de um hotel de Nova Jérsei (CDC, 2008). As principais bactérias associadas a surtos de contaminação alimentar devido a consumo de hortaliças cruas são descritos na TABELA 1.

TABELA 1 – PRINCIPAIS ORGANISMOS RELACIONADOS AOS SURTOS DECORRENTES DA INGESTÃO DE FRUTAS E VERDURAS

Organismo	Surto associado à fruta	Surto associado à verdura	Referências	
BACTÉRIAS	<i>Listeria monocytogenes</i>	não	sim	Farber <i>et al.</i> , 1989; Sado <i>et al.</i> , 1998
	<i>Salmonella</i> spp.	sim	sim	Rude <i>et al.</i> , 1984; Jerngklinchan e Saitanu, 1993
	<i>Escherichia coli</i>	sim	sim	Velaudapillai <i>et al.</i> , 1969; Okafo <i>et al.</i> , 2003
	<i>Streptococcus</i> spp.	sim	sim	Tamminaga <i>et al.</i> , 1978; Soriano <i>et al.</i> , 2000
	<i>Campylobacter</i> spp.	sim	sim	Doyle e Schoeni, 1986; Park e Sanders, 1992
	<i>Shigella</i> spp.	sim	sim	Saddik <i>et al.</i> , 1985; Tauxe <i>et al.</i> , 1997
VÍRUS	Hepatite A	sim	sim	Reid e Robinson 1987; Dentinger <i>et al.</i> , 2001
PROTO-ZOÁRIOS	<i>Cryptosporidium</i> spp.	sim	não	Millard <i>et al.</i> , 1994; Robertson e Gjerde, 2001
	<i>Giardia intestinalis</i>	sim	sim	Mintz <i>et al.</i> , 1993; Robertson e Gjerde, 2001
HELMINTOS	<i>Ascaris</i> spp.	não	sim	Rude <i>et al.</i> , 1984; Raisamen <i>et al.</i> , 1985

FONTE: ADAPTADO DE BASSET E MCCLURE, 2008

Embora as bactérias apresentem maior expressividade quanto aos surtos relacionados aos vegetais, protozoários como *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* também podem ser agentes causadores de surtos de contaminação alimentar. Suas formas de resistência, os cistos e oocistos, não podem proliferar nos tecidos das hortaliças, como as bactérias (SHARMA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2009). Porém, apresentam resistência superior em relação às células bacterianas. Oocistos de *Cryptosporidium*, por exemplo, resistem a 5 ppm de cloro por até 90 minutos (PEREIRA *et al.*, 2008).

2.3 DESCONTAMINAÇÃO DE HORTALIÇAS CONSUMIDAS CRUAS

Para promover a higienização de hortaliças consumidas cruas, os métodos de descontaminação são em geral baseados na adição de algum composto ou produto na água a ser utilizada na lavagem da hortaliça. Derivados clorados são alguns dos compostos utilizados como o cloro livre, o dióxido de cloro, as cloraminas, o hipoclorito de sódio e a ozonização.

INATSU *et al.* (2005), atestaram a eficiência do hipoclorito de sódio para diminuir a população bacteriana de *Escherichia coli* O157:H7 em folhas de repolho chinês assim como também foi comprovada a eficácia deste produto em solução (1000 ppm) na desinfecção de cenouras minimamente processadas prontas para o consumo (GONZÁLEZ *et al.*, 2004).

A ação antimicrobiana do cloro se dá em tempo relativamente curto e à temperatura ambiente (AZEVEDO *et al.*, 1987; DYCHDALA, 1983; FARLAND e GIBB, 1993; TOMINAGA e MIDIO, 1999) justificando sua ampla utilização nos processos de descontaminação de uma gama de produtos.

Contudo, os derivados clorados podem causar efeito prejudicial à saúde devido aos possíveis efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos gerados pela formação de compostos orgânicos clorados, os trialometanos, contidos na água (SELMA *et al.*, 2007; HUANG e BATTERMAN, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2007). A formação dos trialometanos pode afetar negativamente a eficácia dos derivados clorados, pois, quando em situação de alta concentração de matéria orgânica há maior formação dos trialometanos (GONZÁLEZ *et al.*, 2004), cuja reação Espécies halogenadas + Cloro livre + Precusores → Trialometanos + Subprodutos (TOMINAGA e MIDIO, 1999).

O ozônio aparece como uma alternativa para a descontaminação de hortaliças. Trabalhos mostram a redução de 1.8 log de unidades formadoras de colônias de *Shigella sonnei* (SELMA *et al.*, 2007) após 5 minutos de contato com o ozônio a 5 ppm além disso, houve redução de 92% de oocistos de *Cryptosporidium* viáveis após 10 minutos de

exposição ao ozônio a 24°C e de 92,8% após 10 minutos a 18,9°C (WOHLSEN *et al.*, 2007). Korich *et al.* relataram que oocistos de *Cryptosporidium parvum* são 30 vezes mais resistente ao ozônio e 14 vezes mais resistente ao dióxido de cloro quando comparado com cistos de *Giardia duodenalis* submetidos às mesmas condições. O tratamento de folhas de alface com água ozonada para a descontaminação de microorganismos aeróbios não causou nenhum dano à hortaliça (KOSEKI *et al.*, 2001), mostrando sua aplicabilidade no processo de descontaminação de hortaliças.

Apesar de sua eficiência o ozônio apresenta um alto valor comercial chegando a custar cerca de 1 euro por cada m³ utilizado no tratamento de água (DI IACONI *et al.* 2009). Além disto, o uso em escala doméstica ainda não é viável, seja pela disponibilidade comercial de ozonizadores, seja pelo custo para utilização popular.

Um método relativamente simples para desinfecção de hortaliças é o uso de detergente. Raiden *et al.*(2003a, 2003b) observaram que detergentes como o Tween 80 e o lauril sulfato de sódio não tiveram ação prejudicial às células de *Salmonella* e *Shigella* spp. e, em estudos posteriores atestaram que os mesmo detergentes não foram mais eficientes que a água na remoção de *Salmonella* e *Shigella* spp. de superfícies de morangos, tomates e folhas de alface. Samadi *et al.*(2009) sugerem que o pré-tratamento de vegetais através da imersão destes em solução detergente (detergente comum) pode aumentar ligeiramente a eficácia de tratamentos de descontaminação posteriores. Sena *et al.* (2009) investigaram a ação de agentes tensoativos na descontaminação de folhas de alface contaminadas com ovos de *Ascaris* sp. Os produtos que apresentaram maior remoção foram o lauril éter sulfato de amônio e lauril éter sulfato de sódio, 77,2% e 65,2% respectivamente. Apesar do detergente apresentar um valor comercial acessível, não se sabe exatamente se o efeito descontaminante dos diversos produtos detergentes é o mesmo para cada tipo de patógeno, necessitando maiores pesquisas nesta parte.

Substâncias naturais como ácidos orgânicos (acético, láctico, málico, cítrico) têm sido testados para desinfecção de hortaliças (AKBAS E OLMEZ, 2007; UYTTENDAELE *et al.*, 2004), pois há uma tendência crescente a evitar o uso de produtos químicos na preparação dos alimentos (DELIEGHERE *et al.*, 2004). O vinagre é um ácido orgânico produzido a partir de frutas (FANG e HSUEH, 2000) e no Brasil, a imersão de vegetais em soluções de vinagre para auxiliar a desinfecção é popularmente utilizada pela população, embora o conhecimento de sua efetividade seja ainda controverso (COSTA *et al.*, 2009).

Não somente o vinagre como também o suco de limão, já foram testados e comprovados como eficientes na diminuição de *Escherichia coli* e *Salmonella* em vegetais (CHANG e FANG, 2007; SENGUN e KARAPINAR, 2004; 2005). Ácidos orgânicos também foram eficientes na redução de *Listeria monocytogenes* (YANG *et al.*, 2009).

Quanto a protozoários, cistos de *Giardia* expostos à solução de vinagre em tempo inferior a 60 minutos não foram totalmente inativados (COSTA *et al.*, 2009). No entanto, neste trabalho, foi utilizado o produto conhecido como Agrin, cuja composição é vinagre de álcool e de vinho na proporção 9:1, acidez 4%. Não se sabe, entretanto, se o produto auxiliaria pelo menos na remoção destes protozoários, contribuindo para a higienização das hortaliças.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 GERAL

Avaliar se a submersão em solução de vinagre de vinho branco (acidez 6%) e em solução de detergente doméstico (alquil benzeno sulfonato de sódio 3,6%) tem eficiência na remoção de cistos de *Giardia* de alface (*Lactuca sativa*).

3.1.2 ESPECÍFICOS

- Obter cistos de *Giardia* a partir de fezes de humanos para realizar a infecção experimental em folhas de alface
- Avaliar se a submersão de folhas de alface em solução 1:4 de vinagre de vinho facilita a remoção de cistos de *Giardia* desta hortaliça.
- Avaliar se a submersão de folhas de alface em solução 1:20 de solução de detergente facilita a remoção de cistos de *Giardia* desta hortaliça.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE PARASITOS

Cistos de *Giardia duodenalis* foram obtidos por purificação por gradiente de sacarose 1 M e 0,75M (ROBERTS-THOMSON *et al.*, 1976), a partir de fezes de humanos positivos.

As amostras fecais foram fornecidas pelo Laboratório Municipal de Curitiba e foram selecionadas aquelas que apresentassem maior quantidade de cistos. As amostras, contidas em tubos cônicos (15 mL), foram lavadas por centrifugação a 300 x g durante 5 minutos, de três a cinco vezes, até observar-se um sobrenadante límpido. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 4 mL de água destilada. O sedimento foi gotejado lentamente sobre 5 mL de sacarose 1M com o auxílio de uma pipeta e o tubo

centrifugado (300 x g) por 15 minutos. O anel contendo os cistos, formado na interface da amostra e da sacarose, foi retirado com a pipeta e transferido a um novo tubo. Os cistos foram lavados 2 vezes por centrifugação (300 x g, 5 minutos) para a retirada de resíduos de sacarose, suspensos em 1 a 2 mL de água destilada.

Algumas amostras foram novamente purificadas em sacarose 0,75 M, seguindo os mesmos procedimentos já citados. Os cistos purificados foram quantificados em câmara de Neubauer, mantidos sob refrigeração a 4°C, e utilizados em até 1 semana.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VINAGRE E DE DETERGENTES

Vinagre pasteurizado de vinho branco adquirido em supermercado, com acidez informada de 6% (marca La Pastina®), foi utilizado para preparar solução, na proporção 1:4 em água destilada. A solução de detergente foi preparada na proporção 1:20 a partir do produto da marca Urca®, composto alquil benzeno sulfonato de sódio 3,6%. Água destilada foi utilizada como controles.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO VINAGRE E DE DETERGENTE NA REMOÇÃO DOS PARASITOS

Folhas de alface (*Lactuca sativa*) de variedade crespa foram cortadas com diâmetro de 11 cm e contaminadas com 2×10^5 cistos, contidos em 100 µL de água. A suspensão foi distribuída homogeneamente, em volumes de 5 µL, na face adaxial das folhas. Após 20 minutos, cada folha foi imersa em frasco contendo 200 mL de solução de vinagre (1:4) ou água destilada para controle. Os tempos de interação testados foram de 10 minutos e 30 minutos, ao final dos quais cada folha foi removida, levemente agitada sobre o frasco e desprezada. Os cistos presentes na solução foram quantificados, a partir da coleta de uma amostra homogeneizada de 14 mL. A partir do valor obtido nesta amostra, foi estimado o total de cistos removidos da folha. Cada experimento foi repetido três vezes.

A metodologia aplicada ao detergente foi semelhante ao procedimento anteriormente descrito para o vinagre. Ao final de cada tempo (10 e 30 minutos), cada folha foi retirada e desprezada e a contagem de cistos removidos, presentes na solução, foi quantificada a partir de uma amostra de 14 mL, conforme descrito no procedimento realizado com solução de vinagre.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos testes foram expressos como média de 3 experimentos independentes. Os dados foram submetidos ao teste t de Student para avaliar se houve remoção significativa de cistos das folhas devido ao uso das substâncias ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE CISTOS

O aspecto dos cistos antes e após a purificação com sacarose pode ser observado na FIGURA 2. A utilização de sacarose 1M seguida da purificação com sacarose 0,75 M não resultou em maior limpidez do material purificado.

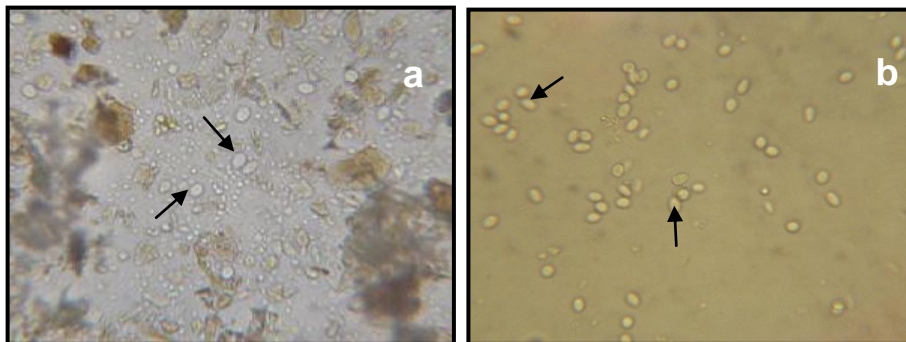


FIGURA 2 – Cistos de *Giardia* (indicados pelas setas) em amostra fecal e sedimentação espontânea (a) e após purificação por gradiente de sacarose 1M (b) (Aumento 400 x) FONTE: O autor (2009)

5.2 EFEITO DO VINAGRE NA REMOÇÃO DE CISTOS DE *Giardia*

A média de cistos removidos das folhas imersas em solução de vinagre em tempo de contato de 10 minutos foi de $(1,11 \pm 0,42) \times 10^5$ (56%) e nas folhas imersas em água foi de $(0,87 \pm 0,13) \times 10^5$ (43,5%). Já a média de cistos removidos das folhas imersas em solução de vinagre submetidos a 30 minutos de contato foi de $(1,26 \pm 0,26) \times 10^5$ (63%) e das folhas imersas em água foi de $(1,17 \pm 0,33) \times 10^5$ (58,5%) (TABELA 2).

TABELA 2 – NÚMERO DE CISTOS DE *Giardia duodenalis* REMOVIDOS DAS FOLHAS IMERSAS NOS TRATAMENTOS VINAGRE E ÁGUA

Experimento	Vinagre 10'	Controle 10'	Vinagre 30'	Controle 30'
1	$1,31 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	$1,06 \times 10^5$	$0,68 \times 10^5$
2	$1,55 \times 10^5$	$0,71 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	$1,67 \times 10^5$
3	$0,48 \times 10^5$	$0,83 \times 10^5$	$1,67 \times 10^5$	$1,19 \times 10^5$
Média \pm DP	$(1,11 \pm 0,42) \times 10^5$	$(0,87 \pm 0,13) \times 10^5$	$(1,26 \pm 0,26) \times 10^5$	$(1,18 \pm 0,33) \times 10^5$
Porcentagem de remoção	56%	43,50%	63%	58,50%

5.3 EFEITO DO DETERGENTE NA REMOÇÃO DE CISTOS DE *Giardia*

A média dos cistos removidos das folhas de alface imersas por 10 minutos em solução de detergente foi de $(1,30 \pm 0,55) \times 10^5$ cistos (65,5%) e nas folhas imersas em água foi de $(0,71 \pm 0,23) \times 10^5$ cistos (35,5%). Em solução de detergente durante 30 minutos a média de cistos removidos foi de $(0,95 \pm 0,15) \times 10^5$ cistos (47,5%) enquanto que água foi de $(1,66 \pm 0,39) \times 10^5$ cistos (83,5%) (TABELA 3).

TABELA 3 – CISTOS RECUPERADOS DAS FOLHAS IMERSAS EM SOLUÇÃO DE DETERGENTE E ÁGUA POR 10 E 30 MINUTOS

Experimento	Detergente 10'	Controle 10'	Detergente 30'	Controle 30'
1	$0,71 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	$1,78 \times 10^5$
2	$2,14 \times 10^5$	$0,71 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$
3	$1,07 \times 10^5$	$0,36 \times 10^5$	$0,71 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5$
Média \pm DP	$(1,31 \pm 0,55) \times 10^5$	$(0,71 \pm 0,23) \times 10^5$	$(0,95 \pm 0,15) \times 10^5$	$(1,67 \pm 0,39) \times 10^5$
Porcentagem de remoção	65,50%	35,50%	47,50%	83,50%

O teste estatístico utilizado indicou que não houve diferença significativa na remoção de cistos das alfaces tratadas com vinagre e detergente, em relação aos controles (cistos mantidos em água) (TABELA 4).

TABELA 4 – VALORES DE p PARA AS COMPARAÇÕES ENTRE CADA TRATAMENTO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO PELO CÁLCULO ESTATÍSTICO t STUDENT

Tratamento	Tempo de exposição	p
Vinagre	10'	0,5239
	30'	0,8175
Detergente	10'	0,2767
	30'	0,0941

*Os controles utilizados em água nos mesmos tratamentos e tempos de exposição apresentou $p > 0,05$.

6 DISCUSSÃO

A avaliação da eficiência de desinfetantes normalmente exige a contaminação experimental com o organismo que se deseja testar. Isto possibilita um controle maior do experimento, assim como a quantificação dos agentes ou a avaliação de sua viabilidade. Com bactérias, isto é facilmente realizado, já que várias delas podem ser cultivadas e a avaliação de viabilidade se dá por contagem de colônias (DO NASCIMENTO e FURLANETTO, 1981; ANDRADE *et al.*, 2005).

Entretanto, os cistos de *Giardia* são formas de resistência que não se multiplicam. As formas císticas podem ser obtidas por meio de cultura, porém dada a sua dificuldade, é um procedimento raramente citado na literatura. É necessário então obter os cistos através de amostras fecais de indivíduos contaminados. Neste trabalho, optou-se por utilizar a técnica de purificação por gradiente de sacarose, pois esta substância apresenta baixo custo. Outras substâncias usadas para purificação por gradiente são o ficoll e o percoll (LAVRENKO *et al.*, 1987; TOVAR *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2009), no entanto, o custo destes produtos é elevado. Apesar de a técnica descrita por Robert-Thomson *et al.* (1976) preconizar o uso de sacarose 1M e uma purificação posterior com sacarose 0,75M, optou-se por utilizar somente a purificação com a primeira etapa na maioria dos experimentos, pois observou-se que a sacarose 0,75M não promoveu uma retirada adicional de detritos das amostras e principalmente, acarretou em uma perda de cistos.

Após a purificação dos cistos e contaminação experimental, realizou-se o procedimento de desinfecção ou remoção. Observou-se que não houve diferença significativa na remoção de cistos de *Giardia* quando utilizado o vinagre ou o detergente, em relação aos controles (água). Também não houve diferença quando comparados os tempos

de exposição dos cistos aos produtos, indicando que a ação removedora dos produtos não é potencializada pelo tempo que os cistos ficaram submetidos ao vinagre e ao detergente.

Quando se trata de higienização de hortaliças, os produtos usados devem inativar ou então facilitar a remoção dos patógenos. A maioria dos trabalhos de desinfecção de hortaliças citados na literatura referem-se à inativação de patógenos, ou seja, existe a preocupação em inviabilizar os organismos. Substâncias detergentes não têm sido capazes de afetar a viabilidade das células bacterianas (SAMADI *et al.*, 2009; TAKEUCHI e FRANK, 2001). Em 2003a, 2003b, Raiden *et al.* observaram que detergentes como o Tween 80 e o lauril sulfato de sódio não tiveram ação prejudicial às células de *Salmonella* e *Shigella* spp. e que os mesmo detergentes não foram mais eficientes que a água na remoção de *Salmonella* e *Shigella* spp. de superfícies de morangos, tomates e folhas de alface.

Com relação ao vinagre, este já foi descrito sendo eficiente na redução de *Salmonella typhimurium* em cenoura (*Daucus carota* L.), rúcula (*Eruca sativa* Miller) e cebolinha (*Allium cepa* L.), sendo que a mistura do vinagre com suco de limão fresco teve maior eficácia na redução sobre as bactérias de modo a reduzi-las a níveis indetectáveis (SENGUN e KARAPINAR, 2004; 2005). Entretanto, não são todas as bactérias que são afetadas pelo vinagre, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 apresentam menor sensibilidade ao ácido em comparação à *Salmonella typhimurium* (YANG *et al.*, 2009).

Com relação a protozoários, não existem estudos envolvendo a sua inativação por detergente e apenas dois são citados quando a substância desinfetante usada é o vinagre. Sadjjadi *et al.* (2006), observaram que a máxima percentagem de inativação de cistos de *Giardia duodenalis* pelo vinagre após 3 horas a 4°C foi de 28,4% enquanto que a 24°C a inativação foi de 40,6%. Contudo, este trabalho utilizou o método de inclusão de eosina para quantificar os cistos viáveis após contato com o vinagre e, no mesmo trabalho, foi comprovada a superestimação da viabilidade dos cistos através deste método (BINGHAM *et al.*, 1979). Os resultados do trabalho de Costa *et al.* (2009) mostram que somente vinagre (4% ácido acético) puro a 21°C foi capaz de reduzir uma grande quantidade de cistos viáveis.

A partir deste trabalho e considerando o uso frequente do vinagre de forma popular pelas brasileiras, procurou-se investigar se este produto não teria pelo menos uma ação facilitadora da remoção. Este efeito não foi observado nos experimentos realizados. É possível que o pequeno número de repetições não tenha sido estatisticamente suficiente para conseguir resultados significativamente diferentes. Apesar disto, se houvesse algum efeito de remoção mais significativo que a água, este efeito teria sido detectado com o número de repetições feitos no presente trabalho, pois Antonioli *et al.* (2005), com apenas duas repetições dos experimentos, obtiveram menores populações de microrganismos em

abacaxi minimamente processado tratado com hipoclorito. Seria interessante realizar novos experimentos com concentrações mais altas de detergente e do vinagre para avaliar se a remoção dos protozoários seria facilitada.

Outra opção de substância que poderia atuar na remoção de cistos das folhas de alface seria o detergente, um agente tensoativo que emulsiona as sujeiras e detritos. Apesar destas características, os experimentos não indicaram efeito na remoção melhor do que o observado pela água pura. Estes resultados foram discordantes com estudos realizados com ovos de *Ascaris* em hortaliças que demonstraram lauril éter sulfato de amônio e lauril éter sulfato de sódio, agentes tensoativos, removeram 77,2% e 65,2% de ovos de folhas de alface, sendo estes valores significativamente maiores que o controle (SENA *et al.*,2009).

Além do uso popular do vinagre em solução para imersão de hortaliças, alguns sites descrevem métodos na higienização de hortaliças e indicam o vinagre como capaz de reduzir o número de microrganismos (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE VINAGRE (ANAV); EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA); UNIÃO DOS MÉDICOS (UNIMED) VALE DO SÃO FRANCISCO), 2009). Contudo, o vinagre atualmente é registrado pelo Ministério e classificado como condimento, não sendo relacionado como desinfetante (GELLI, 1993) apesar de reconhecido efeito sobre a inativação de bactérias.

No presente trabalho, além de uma revisão bibliográfica que indicou que o vinagre não inativa cistos de *Giardia* de forma significativa, demonstrou-se experimentalmente que não houve efeito removedor dos parasitas pelo vinagre e pelo detergente doméstico em comparação com a água. Assim, é importante divulgar medidas como uso das mãos para a lavagem das hortaliças e o uso de água corrente, pois estas ações práticas e simples podem diminuir a possibilidade de uma contaminação alimentar por meio das verduras. Além disto, é importante difundir de forma mais ampla a informação de que o vinagre não tem efeito adequado na higienização de verduras para prevenir todos os patógenos.

7 CONCLUSÃO

O vinagre e o detergente doméstico não apresentaram efeito removedor de cistos de *Giardia duodenalis* de folhas de alface quando comparados à água.

Dado o uso popular de vinagre para desinfecção de verduras pela população brasileira, é importante divulgar que ele não tem eficácia contra todos os tipos de patógenos, reforçando a necessidade de outros tipos de procedimentos para assegurar que os vegetais sejam seguros.

REFERÊNCIAS

ADAM, R.D. The biology of *Giardia* spp. **Microbiologicals reviews**, v. 55, n. 4, p. 706-732, dec. 1991.

AKBAS, M.Y., OLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 619-624, 2007.

ALLENDE, A.; MARTÍNEZ, B.; SELMA, V.; GIL, M. I.; SUÁREZ, J. E.; RODRÍGUEZ, A. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiology**, v.24, n.7-8, p. 759-766, mar. 2007.

AMAHMID, O.; ASMAMA, S.; BOUHOUM, K. The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, n. 1-2, p. 19-26, aug. 1999.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE VINAGRE (ANAV). Dicas. Disponível em: <<http://www.anav.com.br/dica.php?id=22>>. Acesso em: 09/12/2009.

ANDARGIE, G.; KASSU, A.; MOGES, F.; TIRUNEH, M.; HURUY, K. Prevalence of bacteria and intestinal parasites among food-handlers in Gondar town, northwest Ethiopia. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 451-455, dec. 2008.

ANDRADE, F. R. O.; SOUZA, A. A.; ARANTES, M. DO C. B.; DE PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Análise microbiológica de matérias primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 38-44, 2005.

ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETTI, B. C.; FILHO, M. S. M. DE S.; BORGES, M. DE F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 157-160, abr. 2005.

ARMON, R.; GOLD, D.; BRODSKY, M.; ORON, G. Surface and subsurface irrigation with effluents of different qualities and presence of *Cryptosporidium* oocysts in soil and on crops. **Water Science and Technology**, v.46, n. 3, p. 115-122, 2002.

ARHONTIA, S.; KOUTSOUMANIS, K. P. Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behavior of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 1-7, jan. 2009.

AZEVEDO, N. J. M.; PARLATORE, A. C.; ROSSIN, A. C.; MANFRINI, C.; HESPANHOL, I.; CAMPOS, J. R. **Técnica de abastecimento e tratamento de água**. São Paulo: CETESB, 1976. 24 p. Relatório Técnico.

BAERT, L.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2-3, p. 83-94, may 2009.

BASSET, J.; MCCLURE, P. A risk assessment approach for fresh fruits. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 925-943, jan. 2008.

BEUCHAT, L.R. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. **Food Safety Unit World Health Organization**, p. 49, 1998.

BEUCHAT, L.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 845–849, 1999.

BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Produce handling and processing practices. **Emerging Infectious Disease**, v. 3, n. 4, p. 459-465, oct. 1997.

BINGHAM, A. K.; JARROL, E. L.; MEYER, E. A.; RADULESKU, S. *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. **Experimental Parasitology**, v. 47, p. 284-291, 1979.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Salmonella* Litchfield outbreak associated with a hotel restaurant, Atlantic City, New Jersey, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 57, n. 28, p. 775-779, jul. 2008.

CHAIDEZ, C.; SOTO, M.; GORTARES, P.; MENA, K. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 15, n. 5, p. 339-345, oct. 2005.

CHANG, J.M.; FANG, T.J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 24, p. 745-751, 2007.

CHANG, Y.; HSIEH, P. H.; CHAO, C. C. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem with osteogenic potential. **Chang Chung Medical Journal**, v. 32, n. 3, p. 264-275, may/jun. 2009.

CHOJECKA, A.; JAKJMIAK, B.; PODGÓRSKA, M.; RÖHM-RODOWALD, E. The wastewater treatment significance in the control sanitarian and epidemiological state of environment. **Przeegl Epidemiol**, v. 63, n. 3, p. 449-453, 2009.

CHUA, D.; GOH, K.; SAFTNER, R. A.; BHAGWAT, A. A. fresh-cut lettuce in modified atmosphere packages stored at improper temperatures supports enterohemorrhagic *E. coli* isolates to survive gastric acid challenge. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 3, 2008

COSTA, A. O.; SOCCOL, V. T.; PAULINO, R. C.; CASTRO, E. A. Effect of vinegar on the viability of *Giardia duodenalis* cysts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 510-512, jan. 2009.

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 207-227, 2005.

DA SILVA, M. J.; ISHIHARA, Y. M.; SANTOS, K. K. L. Alimentos minimamente processados: uma breve revisão. Jornada Nacional da Agroindústria, 1., 2006, Bananeiras. **Trabalhos publicados...** Bananeiras, 2006.

DELIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273–285, 2004.

DENTINGER, C. M.; BOWER, W. A.; NAINAN, O. V.; COTTER, S. M.; MYERS, G.; DUBUSKY, L. M.; FOWLER, S.; SALEHI, E. D. P. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. **Journal of Infectious Disease**, v. 183, p. 1273-1276, 2001.

DE OLIVEIRA, C. A.; GERMANO, P. M. Presence of intestinal parasites in vegetables sold in the metropolitan area of São Paulo-SP, Brazil. II Research on intestinal protozoans. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 332-335, out. 1992.

DI LACONI, C.; RAMADORI, R.; LOPEZ, A. The effect of ozone on tannery wastewater biological treatment at demonstrative scale. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6121-6124, dec. 2009.

DO NASCIMENTO, D.; FURLANETTO, S. M. P. Determinação quantitativa de grupos de bactérias em sucos de laranja ao natural. **Revista de Saúde Pública**, v. 15, n. 2, 181.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, p. 449-450, 1986.

DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S. Emerging food-borne parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 3, p. 196-206, aug. 2009.

DRAGONE, M.; GIOFFRÈ, A.; MARRAMAO, A. The pathogens responsible for waterborne infections: the biological risk for agricultural laborer. **Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia**, v. 29, n.3, p. 740-742, jul./sep. 2007.

DYCHDALA, G. R. Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 3rd ed. Philadelphia: Lea &Febiger, 1983. p. 157-182.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Dicas ao Consumidor. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/alface.htm>. Acesso em: 09/12/2009.

ETHELBERG, S.; LISBY, M.; VESTERGAARD, L. S.; ENEMARK, H. L.; OLSEN, K. E. P.; STENSVOLD, C. R.; NIELSEN, H. V.; PORSBO, L. J.; PLESNER, A. M.; MØLBAK, K. A Foodborne outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 3, p. 348-356, feb. 2009.

FARBER, J. M. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology- a review. **Journal of Food Protection**, v.54, p. 58-70, 1991.

FARLAND, W. H.; GIBB, H. J. U.S. perspective on balancing chemical and microbial risks of disinfection. In: CRAUN, G. F. **Safety of water disinfection: balancing chemical and microbial risks**. Washington (DC): ILSI Press, 1993. P. 3-10.

FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **The Journal of Parasitology**, v. 77, p. 441-448, 1991.

FORD, B.J. The discovery of *Giardia*. **Microscope**, v. 53, p. 4, 2005.

GELLI, S. D. **Uso do vinagre para desinfecção**. São Paulo: D.O.E.; SEÇÃO I, 1993. 2p. Parecer técnico.

GERNER-SMIDT, P.; WHICHARD, J. M. Surveillance for foodborne disease outbreaks --- United States, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 58, n. 22, p. 609-615, jun. 2009.

GERNER-SMIDT, P.; WHICHARD, J. M. Foodborne disease trends and reports. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 5, 2009.

GOMES, C.; DA SILVA, P.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E.; ELLIS, E. A.; PENDLETON, M. Understanding *E. coli* Internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 3, p. 238-47, nov. 2009.

GONZALEZ, R. J.; LUO, Y.; RUIZ-CRUZ, S.; MCEVOY, J. L. Efficacy of sanitizers to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut carrot shreds under simulated process water conditions. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 11, p. 2375-2380, nov. 2004.

GREIG, J. D.; TODD, E. C.; BARTLESON, C. A.; MICHAELS, B. S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1752-1761, jul. 2007.

GUENTZEL, J. L.; LAM, K. L.; CALLAN, M. A.; EMMONS, S. A.; DUNHAM, V. L. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. **Food Microbiology**, v.25, p. 36-41, 2008.

HAQUE, R.; HUSTON, C.D.; HUGHES, M.; HOUPPT, E.; PETRI, W.A. Current concepts: amebiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1565-1573, 2003.

HANNING, I. B.; NUTT, J. D.; RICKE, S. C. Review Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, 2009.

HAVELAAR, A. H.; BRUL, S.; DE JONG, A.; DE JONGE, R.; ZWIETERING, M. H.; TER KUILE, B. H. Future challenges to microbial food safety. **Internation Journal of Food Microbiology**, oct. 2009.

HIGUTI, S. T. M. **Efeito do vinagre e detergente doméstico na remoção de cistos de *Giardia duodenalis* em folhas de alface crespa (*Lactuca sativa*)**. 40f. Monografia (Especialização em Parasitologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

HUANG, A. T.; BATTERMAN, S. Formation of trihalomethanes in foods and beverages. **Food Additives & Contaminants**, v. 26, n. 7, p. 947-957, jul. 2009.

INATSU, Y.; MAEDA, Y.; BARI, M. L.; KAWASAKI, S.; KAWAMOTO, S. Prewashing with acidified sodium chlorite reduces pathogenic bacteria in lightly fermented Chinese cabbage. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 5, p. 999-1004, may 2005.

JARROL, E.L Jr., BINGHAM, A.K., MEYER, E.A. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 483-487, 1981.

JEMGKLINCHAN, J.; SAITANU, K. The occurrence of *Salmonella* in bean sprouts in Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 24, p. 114-118, 1993.

JOHANNESSEN, G.S.; BENGTSSON, G.B.; HIUR, B.T.; BREDHOLT, S.; WASTESON, Y.; RØRVIK, L.M. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2221-2225, may. 2005.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, n.1, p. 1-38, mar. 2007.

KEIKOTLHAILE, B. M.; SPANOGHE, P.; STEUBART, W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: a meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, oct. 2009.

KIM, H., RYU, J-H; BEUCHAT, L.R. Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 134–143, 2006.

KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C. R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1423-1428, may 1990.

KOSEKI, S.; YOSHIDA, K.; ISOBE, S.; ITOH, K. Decontamination of lettuce using acidic electrolyzed water. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 652-658, may 2001.

KUO, H. W.; KASPER, S.; JELOVCAN, S.; HÖGER, G.; LEDERER, I.; KÖNIG, C.; PRIDNIG, G.; LUCKNER-HORNISCHER, A.; ALLERBERGER, F.; SCHMID, D. A food-borne outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis, Austria, 2008. **Wien Klin Wochenschr**, v. 121, n. 3-4, p. 157-163, 2009.

LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OF PUBLIC HEALTH CONCERN (DPDx).

Parasites of the Intestinal Tract. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Para_Health.htm. Acesso em: 29/03/2010.

LAVRENKO, P. N.; MIKRIUKOVA, O. I.; OKATOVA, O. V. On the separation ability of various ficoll gradient solutions in zonal centrifugation. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 287-297, nov. 1987.

LEAHY, J.G, RUBIN, A.J., SPROULI, O.J. Inactivation of *Giardia muris* cysts by free chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1448-1453, 1987.

LEIFERT, C.; BALL, K.; VOLAKAKIS, N.; COOPER, J. M. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crop in organic and 'low input' production systems: a HACCP-based approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 931-950, oct. 2008.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R. 3RD; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAQUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LONCAREVIC, S.; JOHANNESSEN, G. S.; RØRVIK, L. M. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 186-189, 2005.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A.; SELMA, M. V.; GIL, M. I. Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 167-171, jul. 2009.

MACARISIN, D.; BAUCHAN, G.; FAYER, R. Spinacia oleracea L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: A potential threat for food safety. **Applied and Environmental Microbiology**, nov. 2009.

MARSHALL, M.M.; NAUMOVITZ, D.; ORTEGA, Y.; STERLING, C.R. Waterborne protozoans pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 67-85, jan. 1997.

MATUSZEWSKA, R. Protozoan pathogens of genes *Cryptosporidium* and *Giardia*. Part I. Occurrence in water environment and health risk. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 58, n. 3, p. 569-577, 2007.

MAZARI-HIRIART, M.; LÓPEZ-VIDA, Y.; CASTILLO-ROJAS, G.; PONCE DE LEÓN, S.; CRAVIOTO, A. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in fresh water environments in Mexico City. **Archives of Medical Research**, v. 32, n. 5, p. 458-467, sep./oct. 2001.

MEYER, E.A. Giardiasis: human parasitic diseases. **Elsevier Science**, v. 3, 368 p., 1990.

MILLARD, P. S.; GENSHEIMER, K. F.; ADDISS, D. G.; SOSIN, D. M.; BECKETT, G. A. HOUCKJANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 1592-1596, 1994.

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

MONGE, R.; CHINCHILLA, M.; REYES, L. Seasonality of parasites and intestinal bacteria in vegetables that are consumed raw in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 44, n. 2A, p. 369-375, aug. 1996.

MOTA, A.; MENA, K. D.; SOTO-BELTRAN, M.; TARWATER, P. M.; CHÁIDEZ, C. Risk assessment of cryptosporidium and giardia in water irrigating fresh produce in Mexico. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 10, p. 2184-2188, oct, 2009.

NEI, D.; CHOI, J. W.; BARI, L.; KAWASAKI, S.; KAWAMOTO, S.; INATSU, Y. Efficacy of chlorine and acidified sodium chlorite on microbial population and quality changes of spinach leaves. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 5, 2009.

NIKAIDO, M.; TONANI, K. A.; JULIÃO, F. C.; TREVILATO, T. M.; TAKAYANAGUI, A. M.; SANCHES, S. M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. L. Analysis of bacteria, parasites, and heavy metals in lettuce (*Lactuca sativa*) and rocket salad (*Eruca sativa L.*) irrigated with treated effluent from a biological wastewater treatment plant. **Biological Trace Element Research**, jul. 2009.

NYGARD, K.; SCHIMMER, B.; SØBSTAD, Ø.; WALDE, A.; TVEIT, I. LANGELAND, N.; HAUSKEN, T.; AAVITSLAND, P. A large community outbreak of waterborne giardiasis delayed detection in a non-endemic urban area. **Biomedical Central Public Health**, v. 6, p. 141, 2006.

OKAFO, C. N.; UMOH, V. J.; GALADIMA, M. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated. **Science of the Total Environmental**, v. 311, p. 49-56, 2003.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1275-1281, 1999.

ORTEGA, Y.R.; ADAM, R.D. Giardia: overview and update. **Clinical infectious diseases**, v. 25, p. 545-550, 1997.

OSTERHOLM, M.T., FORFANG, J.C., RISTINEM, T. L., DEAN, A.G., WASHBURN, J.W., GODES, J.R., RUDE, R.A., McCULLOGH, J.G. An outbreak of foodborne giardiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 304, p. 24-28, 1981.

PARK, C. E.; SANDERS, G. W. Occurrence of thermotolerant *Campylobacters* in fresh vegetables sold at farmers outdoor markets and supermarkets. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 313-316, 1992.

PEREIRA, J. T.; COSTA, A. O.; DE OLIVEIRA, S. M. B.; SCHUCHARD, W.; OSAKI, S. C.; DE CASTRO, E. A.; PAULINO, R. C.; SOCCOL, V. T. Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Paraná State, Southern Brazil. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 151, n. 2-3, p. 464-73, dec. 2008.

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

PÖNKA, A.; KOTILAINEN, P.; RIMHANEN-FINNE, R.; HOKKANEN, P; HÄNNINEN, M. L.; KAARNA, A.; MERI, T.; KUUSI, M. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. **Eurosurveillance**, v. 14, n. 18, jul. 2009.

PORTER, J.D., GRAFFNEY, C., HEYMANN, D., PARKIN, W. Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*, **American Journal of Public Health**, v. 80, p. 1259–1260, 1990.

POZIO, E. Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. **Parassitologia**, v. 50, n. 1-2, p. 17-24, jun. 2008.

QUICK, R.; PAUGH, K.; ADISS, D.; KOBAYASHI, J.; BARON, R. Restaurant-associated outbreak of giardiasis. **The journal of International Diseases**, v. 166, n. 3, p. 673-676, sep. 1992.

QUIROZ, E. S.; BERN, C.; MACARTHUR, J. R.; XIAO, L.; FLETCHER, M.; ARROWOOD, M. J.; SHAY, D. K.; LEVY, M. E.; GLASS, R. I.; LAL, A. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 695-700, 2000.

RAGAERT, P; VERBEKE, W.;DEVLIEGHHERE, F.; DEBEVERE, J. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 3, p. 259-270, apr. 2004.

RAIDEN, R. M.; QUICHO, J. M.; MAXFIELD, C. J.; SUMNER, S. S.; EIFERT, J. D.; PIERSON, M. D. Survivability of *Salmonella* and *Shigella* spp. In sodium lauryl sulfate and tween 80 at 22 and 40 degrees C. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 8, p. 1462-1464, aug. 2003a.

RAIDEN, R.M.; SUMMER, S.S.; EIFERT, J.D.; PIERSON, M.D. Efficacy of detergents in removing *Salmonella* and *Shigella* spp. from the surface of fresh produce. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 12, p. 2210-2215, dec. 2003b.

RAISANEM, S.; RUUSKANEN, L.; NYMAN, S. Epidemic ascariasis – evidence of transmission by imported vegetables. **Scandinavian Journal of Primary Health Care**, v. 3, p. 189-191, 1985.

RAVEL, A.; GREIG, J.; TINGA, C.; TODD, E.; CAMPBELL, G.; CASSIDY, M.; MARSHALL, B.; POLLARI, F. Exploring historical Canadian foodborne outbreak data sets human illness Attribution. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 9, p. 1963-1976, sep. 2009.

REID, T. M. S.; ROBINSON, H. G. Frozen raspberries and hepatitis A. **Epidemiology and Infection**, v. 98, p. 109-112, 1987.

RENDTORFF, R. C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **American Journal of Hygiene**, v. 59, p. 209-220, 1954.

RICHARDSON, S. D.; PLEWA, M. J.; WAGNER, E. D.; SCHOENY, R.; DEMARINI, D. M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by products in drinking water: a review and roadmap for research. **Mutation Research**, v. 636, n. 1-3, p. 178-242, sep. 2007.

RODGERS, S.L., CASH, J.N., SIDDIG, M., RYSER, E.T. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 721–731, 2004.

ROBERTS-THOMSON, I. C., STEVENS, D. P., MAHMOUD, A. A., Warren, K. S.

Giardiasis in the mouse: an animal model. **Gastroenterology**, v. 71, p. 57-61, 1976.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in

Norway. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1793-1798, nov. 2001.

ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. Factors affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1799-1805, 2001.

ROBERTSON, L.; GJERDE, B.; HANSEN, E. F.; STACHURSKA-HAGEN, T. A water contamination incident in Oslo, Norway during October 2007; a basis for discussion of boil-water notices and the potencial for post-treatment contamination of drinking water supplies. **Journal of Water and Health**, v. 7, n. 1, p. 55-56, mar. 2009.

ROBERTSON, L. J.; JOHANNESSEN, G. S.; LONCAREVIC, S. Microbiological analysis of seed aprouts in Norway. **Internation Journal of Food Microbiology**, v. 75. n. 1-2, p. 119-126, may 2002.

RUDE, R. A.; JACKSON, G. J.; BIER, J. W.; SAWYER, T. K.; RISTY, N. G. Survey of fresh vegetables fornematodes, amoebae, and *Salmonella*. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 67, p. 613-615, 1984.

SADO, P. N.; JINNEMAN, K. C.; HUSBY, G. J.; SORG, S. M.; OMIECINSKI, C. J. Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1199-1202, 1998.

SADDIK, M. F.; ELSHERBEENY, M. R.; BRYAN, F. L. Microbiological profiles of Egyptian raw vegetables and salads. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 883-886, 1985.

SADJJADI, S. M.; ROSTAMI, J.; AZADBAKHT, M. Giardiacidal activity of lemon juice, vinifer and vinegar on *Giardia intestinalis* cysts. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v. 37, n. 3, p. 24-27, 2006.

SHARMA, M.; INGRAM, D. T.; PATEL, J. R.; MILLNER, P. D.; WANG, X.; HULL, A. E., DONNENBERG, M. S. A novel approach to investigate the uptake and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 1513-20, nov. 2009.

SAMADI, N.; ABADIAN, N.; BAKHTIARI, D.; FAZELI, M. R.; JAMALIFAR, H. Efficacy of detergents and fresh produce disinfectants against microorganisms associated with mixed raw vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1486-1490, jul. 2009.

SAMARA, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Effect of treating surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 degrees C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, v.129, n. 1, p. 1-7, jan. 2009.

SELMA, M. V.; BELTRAN, D.; ALLENDE, A.; VERA, E. C.; GIL, M. I. Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. **Food Microbiology**, v.24, p. 492-499, 2007.

SENA, A.; ZERMAN, L.; BERNE, M. E.; SILVA, P. E.; SCAINI, C. J. Investigação da eficácia de agentes tensoativos na descontaminação de hortaliças contaminadas artificialmente com ovos de *Ascaris sp.* In: Congresso Brasileiro de Parasitologia e Encontro de Parasitologia do Mercosul, 21., 2., 2009, Foz do Iguaçu, **Resumos...** Foz do Iguaçu: 1 CD-ROM.

SENGUN I.Y, KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 301– 305, 2004.

SHIN, G. A.; LINDEN, K. G.; FAUBERT, G. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by polychromatic UV. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 790-792, jun. 2009.

SHINKAWA, N.; NODA, M.; YOSHIMIZU, S.; TOKUTAKE, Y.; SHIRAISHI, T.; ARITA-NISHIDA, T.; NISHIO, O.; OKA, T.; HANSMAN, G. G.; TAKEDA, N.; KIMURA, H. Molecular epidemiology of noroviruses detected in food handler-associated outbreaks of Gastroenteritis in Japan. **Intervirolgy**, v. 51, n. 6, p. 422-426, 2008.

SHIRRON, N.; KISLUK, G.; ZELIKOVICH, Y.; SHIMONI, E.; YARON, S. A comparative study assaying commonly used sanitizers for antimicrobial activity against indicator bacteria and a *Salmonella typhimurium* strain on fresh produce. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 11, p. 2413-2417, nov. 2009.

SLIFKO, T.R.; SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1379-1393, nov. 2000.

STANLEY, S.L. JR. Amoebiasis. **Lancet**, v. 361, p. 1025-1034, 2003.

STEIN-ZAMIR, C.; TALLEN-GOZANI, E.; ABRAMSON, N.; SHOUB, H.; YISHAI, R.; AGMON, V.; REISFELD, A.; VALINSKY, L.; MARVA, E. Salmonella enterica outbreak in a banqueting hall in Jerusalem: the unseen hand of the epidemiological triangle? **Israel Medical Association**, v. 11, n. 2, p. 94-97, feb. 2009.

SORIANO, J. M.; RICO, H.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 123-128, 2000.

TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. H.; BERGAMINI, A. M.; OKINO, M. H.; SILVA, A. A.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. Monitoring of lettuce crops of Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 2, p. 169-174, mar./apr. 2000.

TAKEUCHI, K.; FRANK, J. F. Direct microscopic observation of lettuce leaf decontamination with a prototype fruit and vegetable washing solution and 1% NaCl-NaHCO₃. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1235-1239, aug. 2001.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 31-41, 2002.

TOVAR, J.; COX, S. S. E.; VAN DER GIEZEN, M. A mitosome purification protocol based on percoll density gradients and its use in validating the mitosomal nature of *Entamoeba histolytica* mitochondrial Hsp70. **Methods in Molecular Biology**, v. 390, p. 167-177, 2007.

TAMMINAGA, S. K.; BEUMER, R. R.; KAMPELMACHER, E. H. Hygienic quality of vegetables grown in or imported into Netherlands- tentative survey. **The Journal of Hygiene**, v. 80, p. 143-154, 1978.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge.

Emerging Infectious Diseases, v. 3, p. 425–434, 1997.

TAUXE, R.; KRUSE, H.; HEDBERG, C.; POTTER, M. MADDEN, J.; WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce – a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1400-1408, 1997.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 15-35, 2004.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; WATT, P.; DOWD, S.E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 378-382, feb. 2002.

TOMINAGA, M. Y.; MIDIO, A. F. Exposição humana a trihalometanos presentes e água Tratada. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 4, agosto 1999.

TROLLI, A. C.; IDE, C. N.; PALHANO, F. M. M. DA S.; DA MATTA, M. H. R. Trihalometanos em Água Tratada, após Cloração com Hipoclorito de Sódio, Hipoclorito de Cálcio, Cloro Gasoso e Dicloroisocianurato de Sódio, utilizando Cromatógrafo Gasoso acoplado Espectrofotômetro de Massa, Sistema *Purge and Trap*. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS HÍDRICOS DO CENTRO OESTE CAMPO GRANDE, 2., 2002, Campo Grande. **Simpósios...** Campo Grande: Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 2002.

UNICOMB, L. E.; FULLERTON, K. E.; KIRK, M. D.; STAFFORD, R. J. Outbreaks of Campylobacteriosis in Australia, 2001 to 2006. **Foodborne Pathogens and Diseases**, nov. 2009.

UNIÃO DOS MÉDICOS (UNIMED) VALE DO SÃO FRANCISCO. Cuidados nas lavagens dos alimentos. Disponível em: < http://www.unimedvsf.com.br/secao_clientes/dica.php?id=95>. Acesso em: 09/12/2009.

UYTTENDAELE, M., NEYTS, K., VANDERSWALMEN, Y., NOTEBAERT, E., DEBEVERE, J. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water and thyme essential oil solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 263–271, 2004.

VANDEKINDEREN, I.; VAN CAMP, J.; DEVLIEGHERE, F.; VERAMME, K.; DENON, Q.; RAGAERT, P.; DE MEULENAER, B. Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots (*Daucus carota L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5723-5731, 2008.

VELAUDAPILLAI, T.; NILES, G. R.; NAGARATNAM, W. *Salmonella*, *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli* in uncooked food. **The Journal of Hygiene**, v. 67, p. 187-191, 1969.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. **Water Research**, v. 37, n. 7, p. 1469-1484, apr. 2003.

VUONG, T.A.; NGUYEN, T.T.; KLANK, L.T.; PHUNG, D.C.; DALSGAARD, A. Faecal and protozoan parasite contamination of water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in urban wastewater in Phnom Pehn, Cambodia. **Tropical Medicine & International Health**, v.12, n. 2, p. 73-81, dec. 2007.

WARRINER, K.; HUBER, A.; NAMVAR, A.; FAN, W.; DUNFIELD, K. Chapter 4 recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. **Advances in Food & Nutrition Research**, v. 57, p. 155-208, 2009.

WOLFE, M.S. Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 93-100, 1992.

WOHLSEN, T.; STEWARTS, S.; ALDRIDGE, P.; BATES, J.; GRAY, B.; KATOULI, M. The efficiency of ozonated water from a water treatment plant to inactivate *Cryptosporidium* oocysts during two seasonal temperatures. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 3, p. 433-440, sep. 2007.

YANG, H.; KENDALL, P. A.; MEDEIROS, L.; SOFOS, J. N. Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella typhimurium* with compounds available in households. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 6, p. 1201-1208, jun. 2009.

YODER, J. S.; HLAVSA, M. C.; CRAUN, G. F.; HILL, V.; ROBERTS, V.; YU, P. A.; ALEXANDER, N. T.; CALDERON, R. L.; ROY, S. L.; BEACH, M. J.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events, United States, 2005-2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 57, n. 9, p. 1-29, sep. 2008.

ZHAO, T.; ZHAO, P.; DOYLE, M. P. Inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and poultry skin by combinations of levulinic acid and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 5, p. 928-936, may. 2009.

ZOMER, T. P.; JONG, B. DE; KUHLMANN-BERENZON, S.; NYRÉN, O.; SVENUNGSSON, B.; HEDLUND, K. O.; ANCKER, C.; WAHL, T.; ANDERSSON, Y. A foodborne norovirus outbreak at a manufacturing company. **Epidemiology and Infection**, v. 21, p. 1-6, sep. 2009.