



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE
MESTRADO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE

JOÃO INÁCIO LOPES BATISTA

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E PARASITOLÓGICO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.) COMERCIALIZADA EM MUNICÍPIO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

MOSSORÓ-RN

2018

JOÃO INÁCIO LOPES BATISTA

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E PARASITOLÓGICO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.) COMERCIALIZADA EM MUNICÍPIO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

Linha de Pesquisa: Tecnologias sustentáveis e recursos naturais do semiárido.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra

MOSSORÓ-RN

2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B333d Batista, João Inácio Lopes.
Diagnóstico microbiológico e parasitológico em
alface (*Lactuca sativa* L.) comercializada em
município do semiárido brasileiro / João Inácio
Lopes Batista. - 2018.
52 f. : il.

Orientadora: Ana Carla Diógenes Suassuna
Bezerra.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2018.

1. Contaminação alimentar. 2. Hortaliça. 3.
Enteroparasito. 4. Coliformes. I. Bezerra, Ana
Carla Diógenes Suassuna, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JOÃO INÁCIO LOPES BATISTA

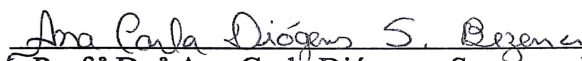
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E PARASITOLÓGICO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.) COMERCIALIZADA EM MUNICÍPIO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

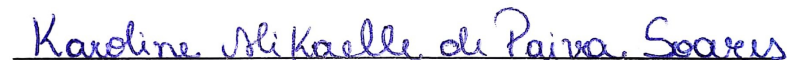
Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

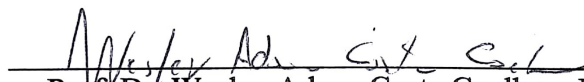
Linha de Pesquisa: Tecnologias sustentáveis e recursos naturais do semiárido.

Defendida em: 25/10/2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra – UFRSA
Presidente da banca e orientadora


Prof.^a Dr.^a Karoline Mikaelle de Paiva Soares – UFRSA
Membro interno ao Programa


Prof. Dr. Wesley Adson Costa Coelho – FACENE
Membro externo à Instituição

Dedico este trabalho a minha família. A eles e por eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade e força para atingir este objetivo.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional, principalmente a meus pais, João Batista e Iris, que me estimulam a buscar sempre o melhor; minha esposa, Juliana, que é meu porto seguro, e aguentou todos os meus estresses nesse período, e meu filho Henrique e minha irmã Ilana, que são minha fonte de inspiração, e me dão forças para continuar.

Agradeço a minha orientadora, professora Ana Carla, não só pelo apoio e orientação, mas também pela amizade e companheirismo. Todos os seus orientados tem muita sorte de terem trabalhado e convivido com você.

Agradeço ao amigo Tallyson Barbosa, por todo apoio, companheirismo e amizade nesses dias, bem como aos demais colegas do laboratório LABIP, Cristina, Sara Cilea, Renata, Laryssa, Lídia, Arielle, Sara Caroline, Amanda e Keven. Os dias com sua convivência certamente foram mais leves e divertidos.

Agradeço a professora Karoline Mikaelle, pela co-orientação, direcionamentos e apoio, principalmente nas análises microbiológicas.

Agradeço as colegas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Barbara Camila e Elisandra Cibely, pela ajuda nas análises microbiológicas, sem vocês não teria conseguido.

Agradeço ao professor Taffarel Torres, e monitora Débora, pela ajuda nas análises estatísticas.

Agradeço aos componentes da banca examinadora, pelas correções e contribuições para melhoria deste trabalho.

E por fim agradeço a UFERSA, como instituição, pela oportunidade de capacitação oferecida e possibilidade de aperfeiçoamento profissional.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços
repetidos dia após dia.”

Robert Collier

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E PARASITOLÓGICO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.) COMERCIALIZADA EM MUNICÍPIO DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

RESUMO

A alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se como a folhosa mais popular e consumida no Brasil, apresentando importância em saúde pública tanto pelo seu aporte nutricional, como pela possibilidade de transmissão de doenças, uma vez que é comumente consumida sem cocção e pode estar contaminada por parasitos e/ou micro-organismos patogênicos. Erros durante a manipulação e a contaminação ambiental ocasionada, por exemplo, pela falta de saneamento básico podem contribuir para a disseminação das doenças transmitidas por alimentos, evidenciando a importância social da investigação parasitária e microbiana, que podem fornecer dados sobre as condições higiênico-sanitárias envolvidas na produção, armazenamento, transporte e manuseio dos alimentos. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi diagnosticar a qualidade microbiana e parasitária de alfaces comercializadas no município de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte. O estudo foi conduzido com amostras coletadas por compra direta em bancas de feira livre e supermercados da cidade. Para a análise microbiológica foi aplicada a técnica de Número Mais Provável (NMP) para determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, além de verificada a presença *Salmonella* sp. Já para a análise parasitológica, foram utilizados o método de sedimentação espontânea de Hoffman com modificações, e o método de centrífugo-flutuação de Faust. A análise estatística foi executada aplicando o teste χ^2 e teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%. Para as análises microbiológicas foram analisadas uma amostra por estabelecimento, onde verificou-se que 100% (12/12) apresentaram contaminação por coliformes totais, 25% (3/12) coliformes termotolerantes acima do permitido e ausência de *Salmonella* sp. Quanto a contaminação parasitária, 62,5% (45/72) estavam contaminadas, sendo diagnosticado os parasitos: ancilostomídeos 40,3% (29/72), *Strongyloides* sp. 29,2% (21/72), *Ascaris* sp. 1,4% (1/72), *Entamoeba histolytica/díspar* 1,4% (1/72), *Endolemax nana* 1,4% (1/72) e *Entamoeba coli* 2,8% (2/72). Outro achado de relevância foi a contaminação física com o diagnóstico de insetos em 19,4% (14/72), além de larvas de *Oesophagostomum* sp. 16,7% (12/72) e outras larvas de nematoides de vida livre sem importância em saúde pública. Entretanto não houve diferença na qualidade parasitária e microbiana entre os locais de comercialização deste estudo. Assim, fica evidenciada a presença de contaminação microbiana e parasitária, determinando a baixa qualidade higiênico-sanitária das alfaces estudadas e o potencial risco a saúde ao qual a população fica exposta.

Palavras-chave: Contaminação alimentar. Hortaliça. Enteroparasito. Coliformes.

MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL DIAGNOSIS IN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) COMMERCIALIZED IN BRAZILIAN SEMI-ARID MUNICIPAL

ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) stands out as the most popular hardwood and consumed in Brazil, presenting importance in public health for its nutritional contribution as well as for the possibility of disease transmission, since it is commonly consumed without cooking and can be contaminated by parasites and / or pathogenic micro-organisms. Errors in handling and environmental contamination caused, for example, by lack of basic sanitation can contribute to the spread of foodborne diseases, highlighting the social importance of parasitic and microbial research, which can provide data on the hygienic-sanitary conditions involved in the production, storage, transport and handling of food. In this context, the objective of this work was to diagnose the microbial and parasitic quality of lettuce commercialized in the city of Mossoró, State of Rio Grande do Norte. The study was conducted with samples collected by direct purchase in public street market stalls and supermarkets in the city. For the microbiological analysis, the Most Probable Number (MPN) technique was applied for the determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, in addition to the presence of *Salmonella* sp. For the parasitological analysis, we used the Hoffman spontaneous sedimentation method with modifications, and the Faust centrifugal-flotation method. Statistical analysis was performed using the χ^2 test and Fisher's exact test, with a significance level of 5%. For the microbiological analyzes, a sample per establishment was analyzed, where 100% (12/12) showed contamination by total coliforms, 25% (3/12) thermotolerant coliforms above the allowed and absence of *Salmonella* sp. Regarding parasitic contamination, 62.5% (45/72) were contaminated, and the parasites were diagnosed: hookworms 40.3% (29/72), *Strongyloides* sp. 29.2% (21/72), *Ascaris* sp. 1.4% (1/72), *Entamoeba histolytica / dispar* 1.4% (1/72), *Endolemax nana* 1.4% (1/72) and *Entamoeba coli* 2.8% (2/72). Another finding of relevance was the physical contamination with the diagnosis of insects in 19.4% (14/72), in addition to *Oesophagostomum* sp. 16.7% (12/72) and other free-living nematode larvae in public health. However, there was no difference in parasite and microbial quality among the commercialization sites of this study. Thus, it is evidenced the presence of microbial and parasitic contamination, determining the low hygienic-sanitary quality of the studied lettuce and the potential health risk to which the population is exposed.

Key words: Food contamination. Vegetable. Enteroparasite. Coliforms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa região urbana de Mossoró-RN – Distribuição dos pontos de coleta em supermercados, em diferentes locais da cidade.	27
Figura 2 – Etapas da análise de coliformes em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.	28
Figura 3 – Etapas da análise de <i>Salmonella</i> sp. em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.	29
Figura 4 – Etapas da análise parasitológica – método de sedimentação espontânea – em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.....	30
Figura 5 – Etapas da análise parasitológica – método de centrifugo-flutuação – em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.....	30
Figura 6 – Feira livre em Mossoró-RN.	36
Figura 7 – Condições de venda de hortaliças em supermercados de Mossoró-RN.....	37
Figura 8 – Parasitos patogênicos encontrados em amostras de alface comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.	39
Figura 9 – Sujidades aparentes em alface comercializada em bancas de feira livre da cidade de Mossoró-RN.	42
Figura 10 – Achados macroscópicos e microscópicos na análise de alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.....	42
Figura 11 – Protozoário ciliado, semelhantes a espécies do gênero <i>Balantidium</i> , encontrado na análise de alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência de contaminação parasitária em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.	34
Gráfico 2 – Frequência de amostras de alface contaminadas com enteroparasitos em relação ao período chuvoso de Mossoró-RN.	38
Gráfico 3 – Frequência de amostras de alface de supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN com parasitas larvas e outros contaminantes.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das análises microbiológicas em alfaces de supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN (NMP/g).	32
Tabela 2 – Frequência de amostras de alface de supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN com parasitas e outros contaminantes.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DCNT Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DTA Doenças Transmitidas por Alimentos

EC *Escherichia coli* Caldo

EMB Eosin Methylene Blue Ágar

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LST Lauril Sulfato Triptose Caldo

NMP Número Mais Provável

OMS Organização Mundial da Saúde

RN Rio Grande do Norte

SS *Salmonella Shigella* Ágar

VB Verde Brilhante Caldo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	Hortaliças na alimentação	15
2.1.1	Alface	15
2.2	Contaminação biológica e segurança alimentar dos vegetais	16
2.3	Qualidade microbiológica dos alimentos	17
2.3.1	Coliformes.....	18
2.3.2	<i>Salmonella</i> sp.	19
2.4	Enteroparasitos	20
2.4.1	<i>Entamoeba histolytica/díspar</i>	20
2.4.2	<i>Giardia lamblia</i>	21
2.4.3	<i>Ascaris lumbricoides</i>	21
2.4.4	Ancylostomatidae.....	22
2.4.5	<i>Strongyloides stercoralis</i>	23
2.4.6	<i>Toxocara</i> sp.	23
3	OBJETIVOS	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	Determinação da população	26
4.2	Coleta das amostras	26
4.3	Análises microbiológicas	27
4.4	Análises parasitológicas	29
4.5	Avaliação das condições higiênico sanitária dos estabelecimentos	30
4.6	Análise estatística	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Análises microbiológicas	32
5.2	Análises parasitológicas	34
6	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Manter uma alimentação saudável é essencial para uma boa qualidade de vida, sendo as hortaliças amplamente recomendadas pela sua composição de vitaminas, sais minerais e fibras (BARBOSA et al., 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de frutas e verduras como prioridade das políticas nutricionais, porém o consumo desses alimentos no Brasil ainda é baixo quando comparado a outros países (WHO, 2003; JAIME et al., 2009).

As hortaliças podem ser consideradas de importância para saúde pública, tanto pelo seu aporte nutricional, como pela possibilidade da transmissão de doenças, uma vez que são amplamente consumidas sem cocção e podem estar contaminadas com ovos, larvas, cistos de parasitas (GREGÓRIO et al., 2012; EZATPOUR et al., 2013), além de bactérias patogênicas, tornando-se importante via de disseminação de enteroparasitoses e gastroenterites. As parasitoses são comuns em países em desenvolvimento como o Brasil devido ao acesso limitado aos serviços de saúde, falta de saneamento básico, além de baixo nível socioeconômico, educacional e cultural da população, que influenciam decisivamente nas condições de saúde da população (IVO DE CARVALHO, 2013; LIMA et al., 2013; HOTEZ; FUJIWARA, 2014).

Dentre as hortaliças, a alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se como um dos vegetais folhosos mais populares e de consumo *in natura* (HAN et al., 2018). Esse vegetal pode ser cultivado pelo método convencional, orgânico e hidropônico, sendo que os primeiros, realizados diretamente no solo, ficam mais expostos a contaminação (DRISSNER; ZUERCHER, 2014). As hortaliças folhosas são facilmente contaminadas por conterem maior superfície de contato, folhas justapostas e flexíveis que favorecem o acúmulo de resíduos, além de serem cultivadas diretamente em contato com o solo, facilitando a contaminação por micro-organismos (ARBOS et al., 2010; TEFERA et al., 2018).

Dentre as principais parasitoses de importância médica prevalentes no Brasil e que podem acometer alimentos consumidos *in natura*, citam-se a giardíase, amebíase, teníase, ancilostomíase e ascaridíase (ROBERTSON et al., 2014; DAVID et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017). Estes parasitos podem ocasionar doenças debilitantes com quadros agudos de diarreia e desnutrição, com o comprometimento do desenvolvimento físico e intelectual, principalmente na parcela mais jovem da população, além de gerar complicações que podem culminar com o óbito (LUDWIG et al., 1999; NEVES et al., 2016). Enquanto as bactérias

representaram 95,9% dos agentes conhecidos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) no Brasil em 2016-2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A contaminação das hortaliças pode acontecer em vários momentos, seja durante o plantio, pelo uso de água contaminada na irrigação, na utilização de adubos orgânicos contendo dejetos fecais, durante o transporte e comercialização, como também na manipulação pelo produtor, vendedor e consumidor final (TEFERA et al., 2018). Devido à falta de condições estruturais e de higiene, a comercialização de produtos crus em feiras livres ocasiona uma maior exposição aos patógenos contaminantes, podendo comprometer a qualidade dos alimentos e colocar em risco a saúde dos consumidores. Entretanto os supermercados também apresentam prevalência de contaminação das hortaliças por enteroparasitos (ESTEVES; FIGUEIRÔA, 2012; NASCIMENTO; ALENCAR, 2014).

Estudos têm demonstrado a contaminação da alface produzida em diversas partes do Brasil e do mundo por micro-organismos e parasitas (BARBOSA et al., 2016; MAFFEI et al., 2016; MRITUNJAY; SCHERER et al., 2016; KUMAR, 2017), assim, devido ao alto consumo dessa hortaliça na dieta da população, e dado o risco de contaminação biológica como problema de saúde pública, considerando ainda a inexistência de estudos locais que mensurem a qualidade da alface comercializada, o objetivo desse trabalho foi de diagnosticar a qualidade microbiana e parasitária em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas no município de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Hortaliças na alimentação

Hortaliças e frutas são componentes importantes nas refeições diárias em razão do aporte nutricional, como auxílio a uma alimentação equilibrada e saudável. Uma dieta adequada deve ser capaz de fornecer os nutrientes e energia necessários para suprir as necessidades do consumidor, devendo ser composta de alimentos de diferentes grupos nutricionais (BVENURA; SIVAKUMAR, 2017).

Nesse sentido, a ingestão de hortaliças é amplamente recomendada pela sua composição de vitaminas, sais minerais e fibras (BARBOSA et al., 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de frutas e hortaliças como prioridade das políticas nutricionais, como fator importante na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), entre elas o diabetes, câncer, obesidade, acidente vascular cerebral, infarto e hipertensão arterial (WHO, 2003; BVENURA; SIVAKUMAR, 2017; LELONG et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; TANG et al., 2017).

Apesar disso, o consumo de hortaliças ainda é baixo. A OMS recomenda a ingestão diária de pelo menos 400g de frutas e hortaliças, ou cinco porções diárias (WHO, 2003), porém estudos mostram que a aquisição e consumo destes itens podem estar relacionados a diversos fatores, como nível de escolaridade, hábitos e conscientização com a saúde, além da facilidade de acesso aos alimentos na região residente (SILVA; COELHO, 2014). Estima-se que 78% da população de países de baixa e média renda, incluindo o Brasil, consomem menos do que o mínimo recomendado de porções diárias de frutas e vegetais (HALL et al., 2009), apesar do apelo das políticas públicas ante a alimentação saudável como fator de promoção à saúde e prevenção de doenças (FERREIRA; CHIARA; CAETANO, 2007; JAIME et al., 2009).

2.1.1 Alface

Dentre as hortaliças, a alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se como a folhosa mais popular e consumida no Brasil (HENZ; SUINAGA, 2009). Pertencente à família Asteracea, se desenvolve bem em climas amenos, podendo ser cultivada durante todo o ano a um baixo custo de produção, estando bastante presente nas hortas domésticas (SCHERER et al., 2016).

Do ponto de vista nutricional, possui grande variedade de micronutrientes, como cálcio, ferro, potássio, vitaminas C e E, compostos antioxidantes como polifenóis e carotenóides, além de possuir baixo valor calórico, o que demonstra sua popularidade nas dietas (NICOLLE et al., 2004; BARBOSA et al., 2016; SCHERER et al., 2016).

Atualmente, existe uma grande variedade de cultivares no mercado, em diferentes cores, formatos e tamanhos, sendo as mais consumidas no Brasil as variedades crespa, americana e lisa (SUINAGA et al., 2013). Segundo Sala; Costa (2012), nas últimas décadas o consumo da alface tipo crespa superou os demais por vantagens de adequação aos sistemas de transporte e distribuição, contribuindo para redução de perdas. A alface tipo crespa apresenta folhas flabeladas, bordos foliares ondulados, folhas tenras, flexíveis e de coloração verde claro (SALA; COSTA, 2012). Por apresentar curta vida pós-colheita, as zonas produtoras comumente estão localizadas próximas aos grandes centros metropolitanos brasileiros (HENZ; SUINAGA, 2009), tendo caráter de distribuição regional.

Esse vegetal pode ser cultivado pelo método convencional, orgânico e hidropônico, sendo que os primeiros, realizados diretamente no solo, ficam mais expostos à contaminação por micro-organismos e estruturas parasitárias (DRISSNER; ZUERCHER, 2014). Os cultivos tradicional e orgânico consistem na transferência de mudas diretamente para o solo com aporte adequado de água e nutrientes; entretanto o método orgânico visa produzir alimentos mais saudáveis e nutritivos sem a utilização de substâncias químicas, como fertilizantes e agrotóxicos (GOMIERO, 2017). Já na hidroponia, a cultura do solo é substituída por suportes elevados, contendo solução nutritiva de água com nutrientes minerais dissolvidos de forma balanceada, sendo utilizada com bastante produtividade no cultivo da alface (BARBOSA et al., 2016).

2.2 Contaminação biológica e segurança alimentar dos vegetais

Nos últimos anos, vem crescendo a preocupação da população com a qualidade e segurança dos alimentos. Estes devem ser produzidos seguindo boas práticas e normas que garantam produtos seguros para a população. A qualidade do alimento está diretamente relacionada à segurança alimentar e nutricional, que consiste no acesso regular e permanente aos alimentos, em quantidade suficiente as necessidades humanas, e tendo como base a promoção do estado de saúde daqueles que os consomem (BRASIL, 2006; SILVA et al., 2011). Assim, entende-se que não haverá uma alimentação segura se o consumidor tiver acesso a alimentos contaminados e que ocasionem agravos a saúde.

Ao falar de hortaliças, deve-se levar em consideração que estes itens apresentam grande exposição ao meio ambiente, o que lhes proporciona uma contaminação por microbiota compatível com o solo em que esses vegetais foram cultivados, assim, apesar dos mecanismos intrínsecos de muitas frutas e hortaliças, como camada protetora e pH abaixo do limite de crescimento de muitos micro-organismos, ainda é comum o estabelecimento de bactérias não patogênicas que posteriormente poderão participar da deterioração dos mesmos (JAY, 2005).

Diversos mecanismos podem, entretanto, propiciar a contaminação destes alimentos por micro-organismos patogênicos, desde a contaminação do solo ou água para irrigação, utilização de adubos orgânicos contendo dejetos fecais, presença de animais (domésticos e/ou selvagens) no cultivo, processamento dos vegetais com manuseio inadequado, erros de manejo alimentar durante transporte e comercialização, como também na manipulação pelo vendedor e consumidor final (BARBOSA et al., 2016; TEFERA et al., 2018). Além disso, as hortaliças folhosas são facilmente contaminadas por conterem maior superfície de contato, folhas justapostas e flexíveis que favorecem o acúmulo de resíduos, além de serem cultivadas diretamente em contato com o solo, facilitando a contaminação microbiológica (ARBOS et al., 2010; DRISSNER; ZUERCHER, 2014).

A contaminação das hortaliças se agrava em razão do habitual consumo sem cocção, devendo assim ser considerada de importância para saúde pública, tanto pelo seu aporte nutricional desses alimentos, como também pela possibilidade da transmissão de doenças. A contaminação pode ocorrer pela forma de ovos, larvas e cistos de parasitos (GREGÓRIO et al., 2012), além de bactérias, representando importante via de disseminação de enteroparasitoses e gastroenterites.

2.3 Qualidade microbiológica dos alimentos

As frutas e hortaliças são fundamentais na dieta em qualquer parte do mundo. Os avanços nas tecnologias de produção, conservação, distribuição e marketing vêm permitindo a indústria de alimentos oferecer quase todos os tipos de frutas e hortaliças frescos a consumidores em qualquer parte do mundo (ROBERTSON et al., 2014). Entretanto, essas mesmas tecnologias aumentam o risco de DTAs, podendo facilitar a propagação de doenças infecciosas, uma vez que pode expor a população a uma ampla gama de micro-organismos patogênicos (BEUCHAT, 1995).

Neste sentido, a incidência de agentes microbianos reflete a qualidade higiênico-sanitária da produção, processamento e comercialização dos vegetais (JAY, 2005). Diversos autores têm demonstrado a presença de micro-organismos e enteroparasitos patogênicos nestes alimentos, destacando a importância do estudo para saúde pública (BELETINI; TAKIZAWA; TAKIZAWA, 2014; RODRIGUES et al., 2014; COLLI et al., 2015; MAFFEI et al., 2016; MRITUNJAY; KUMAR, 2017; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2017). Dentre os agentes infectantes, as bactérias representaram 95,9% dos patógenos conhecidos causadores de DTAs no Brasil em 2016-2017, com destaque para *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. como as principais diagnosticadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A legislação brasileira através da RDC/Anvisa nº 12/2001, estabelece limites microbiológicos de até 100 NMP/g de coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* sp. nas hortaliças *in natura* (BRASIL, 2001). A Resolução-CNNPA nº 12/1978 preconiza ainda a inexistência de sujidades, parasitas e larvas (BRASIL, 1978).

2.3.1 Coliformes

Os coliformes representam um grupo de bactérias utilizadas como indicadores de contaminação fecal, sendo utilizados a mais de cem anos como parâmetro bacteriano, na caracterização e avaliação da qualidade de alimentos e água (MARTIN et al., 2016). São representados de forma geral por quatro gêneros da família Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (JAY, 2005) e podem ainda ser divididos laboratorialmente em coliformes totais e coliformes termotolerantes (SOUSA, 2006).

Com relação aos coliformes totais, sua detecção em água e alimentos não representa necessariamente contaminação fecal, uma vez que os micro-organismos desse grupo tem capacidade de colonização ambiental e não tem origem exclusivamente entérica, podendo ser encontrados na água, solo, vegetação, insetos, dentre outros (MARTIN et al., 2016). Laboratorialmente, os coliformes totais compõem um grupo de bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos e capazes de fermentar a lactose, produzindo ácido e gás à 35-37°C (FRITTOLI; RODRIGUES, 2014). Enquanto que os coliformes termotolerantes são bactérias de origem comprovadamente fecal por sua baixa capacidade de colonização ambiental (SOUSA, 2006). Eles produzem ácidos e gases, suportando temperaturas entre 44-46°C. A principal representante é a *Escherichia coli*, considerada como o melhor indicador de contaminação fecal (JAY, 2005).

Dessa forma, a detecção de coliformes totais indica falhas nas condições higiênicas de produção do alimento, enquanto que os coliformes termotolerantes são utilizados como indicadores da qualidade sanitária do alimento, indicando a presença de *E. coli* dentre outros (FENG et al., 2002).

E. coli é considerado um micro-organismo comensal, estando presente em grande número no intestino humano, mas também pode se comportar como patógeno-oportunista, uma vez que pode causar doenças gastrointestinais e extraintestinais (FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2002). Vários sorotipos virulentos dessa bactéria têm sido implicados em doenças diarreicas, surtos de gastroenterites, infecções do trato urinário e sepse, constituindo um grave problema de saúde pública. As cepas podem ser classificadas por mecanismos de patogenicidade (adesinas e exotoxinas), subdividindo-se em cinco grupos principais: enterotoxigênica, enteropatogênica, enteroagregativa, enterohemorrágica e enteroinvasiva (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Estima-se que *E. coli* patogênica seja responsável por 780-900 milhões de casos de diarreia por ano no mundo, e pelo menos 300 mil mortes (TORRES, 2009).

2.3.2 *Salmonella* sp.

Salmonella é uma espécie de bastonetes gram-negativos, não esporulado, amplamente distribuído na natureza e que pode usar o homem ou animais como reservatório (JAY, 2005). Seu habitat primário é o intestino de aves, répteis, roedores, gado, animais domésticos e homem, perfazendo um ciclo fecal-oral. Existem mais 2500 sorotipos da *Salmonella enterica* já descritos, sendo a *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi altamente adaptadas ao homem (ENG et al., 2015).

Estima-se que haja 21 milhões de infecções por *S. Typhi* por ano, com 200 mil mortes em todo o mundo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). A maioria das infecções é resultante de água e alimentos contaminados, incidindo principalmente sobre crianças e maiores de 60 anos. As fontes domésticas mais comuns são as carnes de aves, ovos, laticínios e alimentos preparados em superfícies contaminadas, como tábuas de corte (ANDINO; HANNING, 2015).

A baixa dose infectante para infecções por *S. Typhi* permite também a transmissão pessoa-pessoa, adicionalmente esse micro-organismo tem capacidade de multiplicar-se intensamente em alimentos acondicionados inadequadamente, em temperatura ambiente, inclusive hortaliças (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). O quadro clínico

resultante varia entre colonização assintomática, gastroenterite, febre entérica até septicemia (ANDINO; HANNING, 2015).

2.4 Enteroparasitos

A globalização vem mudando os hábitos de consumo e comércio de alimentos, causando um impacto global também na disseminação de infecções alimentares causadas por parasitos (ORLANDI et al., 2002; ROBERTSON et al., 2014). Estima-se que 107 espécies possam ser transmitidos por alimentos e causar doenças no homem (ORLANDI et al., 2002), sendo de suma importância o monitoramento da prevalência desses em hortaliças e alimentos comercializados (GOMES NETO et al., 2012).

O parasitismo pode ser definido como uma forma de interação entre seres vivos, onde há unilateralidade de benefícios, sendo um dos associados prejudicado pela associação. Deste modo, o parasito é considerado agressor, e o hospedeiro é espoliado, fornecendo nutrientes e abrigo para o primeiro (NEVES et al., 2016). Dentre os de acometimento intestinal patogênicos mais comuns no Brasil, citam-se a *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Taenia* sp., *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp., *Trichuris trichiura*, dentre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; LIMA et al., 2013; OLIVEIRA; SILVA, 2016).

2.4.1 *Entamoeba histolytica/dispar*

E. histolytica é o agente etiológico da amebíase, doença de grande impacto em saúde pública, por causar cerca de 100 mil óbitos por ano no mundo, e apesar desses números, grande parte da população é assintomática, o que sugere a infecção por *E. dispar* (NEVES et al., 2016). Indistinguíveis visualmente, estes apresentam-se como parasitos unicelulares, com ciclo biológico relativamente simples e dividido entre a fase móvel (trofozoíto) e de resistência, infectante (cisto) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Sua transmissão se dá pela ingestão dos cistos infectantes, excretados junto as fezes, que ocorre principalmente pela contaminação de água e alimentos em localidades de condições sanitárias precárias, apresentando ocorrência mundial (PRAKASH; BHIMJI, 2017).

A amebíase pode apresentar-se assintomática, intestinal ou extraintestinal dependendo da virulência da cepa, causando dores abdominais, colites diarreicas, e podendo gerar danos

teciduais graves com formação de abscessos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; PRAKASH; BHIMJI, 2017).

2.4.2 *Giardia lamblia*

Giardia lamblia (ou *G. duodenalis*, ou *G. intestinalis*) é um protozoário flagelado de distribuição mundial, destacando-se como um dos mais frequentes parasitos encontrados nos exames parasitológicos, especialmente nos países subdesenvolvidos (NEVES et al., 2016). Tem ciclo fecal-oral, onde os cistos são a forma infectante, e uma vez liberados junto as fezes, podem se disseminar no ambiente, contaminando água, alimentos e objetos, enquanto as formas trofozoitas e móveis, colonizam o duodeno e jejuno, dividindo-se por fissão binária, e tem a característica de fixar-se nas vilosidades das células intestinais, causando inflamação local (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

É comum a ocorrência de surtos em locais de aglomeração humana (principalmente creches e escolas), sendo fatores de risco a exposição a condições sanitárias inadequadas, viagens a áreas endêmicas e consumo de água não tratada (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Na giardíase até 40% dos infectados podem permanecer assintomáticos, entretanto pode ocorrer diarreia de moderada a autolimitada, além de síndrome de má absorção com perda de peso, podendo ser observadas formas mais graves em pessoas imunodeficientes (CAMA; MATHISON, 2015; REY, 2017).

2.4.3 *Ascaris lumbricoides*

É popularmente conhecido como lombriga. Pertence a classe Nematoda e possui ampla distribuição mundial, variando de frequência pelas condições climáticas, ambientais, e principalmente pelo desenvolvimento socioeconômico da população (NEVES et al., 2016). É estimada como a helmintíase mais comum no mundo, infectando mais de um bilhão de pessoas (CORVINO; BHIMJI, 2017). É muito prevalente em países subdesenvolvidos, onde o saneamento é precário (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

A fase adulta caracterizam-se pela forma longa, robusta e cilíndrica, podendo medir até 40 cm, onde as fêmeas podem depositar até 200 mil ovos por dia, sendo estes muito resistentes no meio ambiente além de apresentarem uma membrana externa mamilonada que lhes confere aderência e facilita sua disseminação (NEVES et al., 2016).

Sua transmissão se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados com ovos do parasito. Muitos autores relatam a contaminação de hortaliças com ovos de *Ascaris lumbricoides*, que ocorre provavelmente pela irrigação de hortas com água servida (ESTEVES; FIGUEIRÔA, 2012; BELETINI; TAKIZAWA; TAKIZAWA, 2014; BARBOSA et al., 2016).

A intensidade dos sintomas clínicos depende do número de parasitos presentes no hospedeiro, podendo haver desde infecções assintomáticas até casos graves com obstrução do lúmen intestinal. A migração das formas larvar e adulta pelo corpo podem ocasionar danos teciduais diversos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

2.4.4 Ancylostomatidae

A família Ancylostomatidae apresenta vários nematoídeos, sendo os mais importantes pela patogênese humana *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014), além do *Ancylostoma caninum*, espécie hospedeira de cães, que pode causar infecção autolimitada em humanos, geralmente causando a síndrome de larva migrans (VELHO et al., 2003). São transmitidos pelo solo contaminado, sendo mais um exemplo de doença negligenciada, atingindo áreas de pobreza com deficiência de estrutura sanitária e serviços de saúde (NEVES et al., 2016).

São parasitas cilíndricos e hematófagos, apresentando como principal característica morfológica uma capsula bucal com presença de lancetas ou dentes cortantes. Seu ciclo se inicia na eclosão dos ovos no solo, originando larvas L1 e L2 rabditóides, que sofrem posterior muda para larva L3, filarióide infectante. Esta forma pode penetrar na pele íntegra humana, chegando a circulação, passando por um ciclo pulmonar e chegando finalmente ao intestino, onde depositam de 10 a 20 mil ovos por dia (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

A infecção pode ser leve, sem sintomas, porém prurido, coceira, fezes sanguinolentas e dor abdominal podem aparecer na infecção por ancilostomídeos. Pode ocorrer ainda anemia e prejuízo ao crescimento devido a deficiência de vitaminas e desnutrição (SAHIMIN et al., 2017).

2.4.5 *Strongyloides stercoralis*

A estrogiloidíase é mais uma helmintíase transmitida pelo solo, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde o saneamento deficiente facilita a transmissão por contaminação fecal (NUTMAN, 2017). O gênero *Strongyloides* contempla pelo menos 52 espécies, sendo o *Strongyloides stercoralis* o principal responsável pelas infecções em humanos, podendo ocorrer também em cães, gatos e primatas (NEVES et al., 2016).

Apesar das semelhanças epidemiológicas e morfológicas com os ancilostomídeos, *S. stercoralis* tem algumas particularidades no ciclo biológico, como a possibilidade de desenvolvimento de um ciclo de vida livre não parasitário fora do hospedeiro (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). No ciclo de desenvolvimento direto as larvas infectantes penetram ativamente na pele do hospedeiro, entrando na circulação e fazendo o curso pulmonar, sendo posteriormente deglutidas e completando o desenvolvimento no intestino (REY, 2017). Posteriormente as fêmeas adultas põem seus ovos na mucosa intestinal, eclodindo em larvas rhabditóides que são eliminadas junto as fezes, podendo continuar o ciclo direto, transformando-se em larvas filarióides infectantes, ou se desenvolver em vermes adultos de vida livre em um ciclo indireto. Neste último caso, após sucessivas gerações, novas larvas evoluem finalmente à filarióides infectantes, voltando ao parasitismo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

As manifestações clínicas são variáveis, podendo ocorrer irritações na pele, tosse ou irritação traqueal na fase aguda, enquanto que na fase crônica é frequentemente assintomática. As principais complicações ocorrem com a autoinfecção e hiperinfecção, principalmente em imunodeficientes, podendo levar a lesões gastrointestinais, pulmonares e sepse (NUTMAN, 2017).

2.4.6 *Toxocara* sp.

Os parasitas do gênero *Toxocara* também pertencem a classe Nematoda, contendo as espécies *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, que são parasitas naturais de cães e gatos respectivamente, podendo infectar humanos acidentalmente e causar doenças como a síndrome da Larva Migrans Visceral (LMV), Larva Migrans Cutânea (LMC) e Larva Migrans

Ocular (LMO), dependendo de sua localização (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; NEVES et al., 2016).

A infecção pode se dar pela penetração ativa das larvas L3 na pele íntegra humana, que neste caso migra por semanas no tecido subcutâneo, deixando um rastro popularmente conhecido como “bicho geográfico” (NEVES et al., 2016). Porém, assim como acontece com outras zoonoses dos helmintos, as larvas destas espécies não conseguem amadurecer até a fase adulta no hospedeiro humano, causando normalmente inflamação local limitada (ZIBAEI, 2016).

Menos comumente as larvas podem ser ingeridas e vagar por tecidos e órgãos, principalmente pulmões, fígado, miocárdio, rim, sistema nervoso central e globo ocular (LMO), resultando em manifestações clínicas como sangramentos, formações de granulomas e pontos de necrose (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Neste contexto, a contaminação ambiental por enteroparasitas e micro-organismos patogênicos, ocasionada pela falta de saneamento básico pode contribuir para a disseminação das doenças transmitidas por alimentos, cujas complicações podem determinar relevante problema de saúde pública. Fica evidenciada então a importância social da investigação parasitária e microbiana, uma vez que estes dados podem fornecer informações sobre as condições higiênico-sanitárias dos alimentos, sendo fundamental para a garantia da qualidade dos alimentos, prevenção de doenças e segurança alimentar.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Realizar diagnóstico microbiológico e parasitológico da alface (*Lactuca sativa* L.) comercializada no município de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte.

Objetivos específicos:

- Realizar análise microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em bancas de feiras livres e supermercados, para detecção de *Salmonella* sp. e determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes.
- Realizar análise parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em bancas de feira livres e supermercados;
- Realizar inspeção visual qualitativa nos estabelecimentos, quanto às normas de boas práticas em serviços de alimentação;
- Avaliar a qualidade higiênico-sanitária de alfaces (*Lactuca sativa* L.) *in natura* comercializadas em Mossoró-RN.

4 METODOLOGIA

O estudo foi conduzido no município de Mossoró (05°11'15"S 37°20'39"W), Estado do Rio Grande do Norte (RN), localizado no semiárido Brasileiro, com temperatura média de 28°C e pluviosidade de cerca de 835 mm/ano, concentrados entre os meses de fevereiro e maio (INMET, 2018). As coletas foram realizadas em bancas de feira livre e supermercados da região urbana da cidade, que comercializavam alfaces de cultivo convencional na ocasião do estudo.

4.1 Determinação da população

O presente estudo foi o primeiro do gênero realizado em Mossoró-RN considerando a abrangência total do município, logo não eram conhecidas características como média e desvio padrão da população, bem como a proporção de eventos que se desejava estudar. Portanto, foi feito uso da recomendação de Levine; Berenson; Stephan (2000) que substitui os valores das proporções \hat{p} e \hat{q} por 0,5.

O município de Mossoró-RN possui cerca de 250.000 habitantes (IBGE, 2013), categorizando-se como uma população infinita (>10000 indivíduos), não necessitando de correção do n amostral (MIOT, 2011). Desta forma, foi utilizada a seguinte equação:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

Sendo: n = Número de indivíduos na amostra; $Z_{\alpha/2}$ = Valor crítico, indicando o nível de confiança adotado (90% neste caso); E = Margem de erro máxima da estimativa; p = Proporção de indivíduos que pertencem a categoria em estudo; q = Proporção de indivíduos que não pertencem a categoria em estudo, sendo que: $q = 1 - p$.

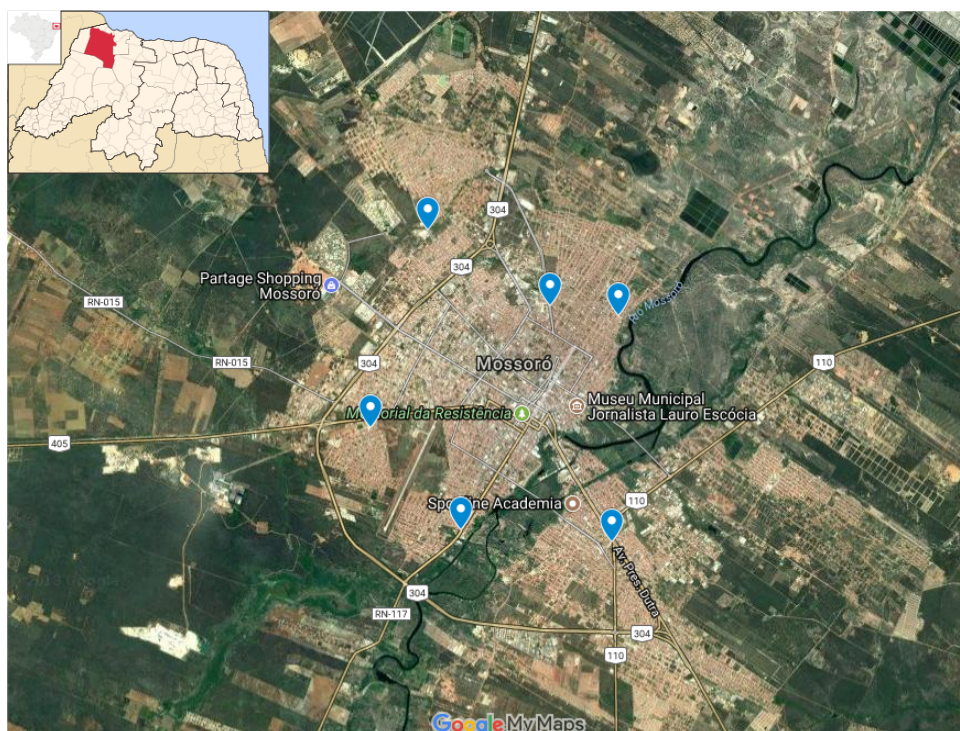
Realizando os cálculos para o nível de confiança de 90% e erro máximo de 10% temos o $n = 68$. Portanto, foram coletadas 72 amostras da hortaliça, sendo 36 para supermercados e 36 para feiras livres.

4.2 Coleta das amostras

As coletas foram realizadas mediante compra direta nos estabelecimentos, no período de dezembro/2017 a abril/2018, e ocorreram em 6 (seis) supermercados de redes aleatórias,

distribuídos nos bairros mais populosos (IBGE, 2013) e em diferentes pontos da cidade (Figura 1), e 3 (três) bancas de feira livre cadastrada junto a prefeitura do município. Em cada coleta foram adquiridas 6 (seis) amostras aleatórias, de alface tipo crespa provenientes de cultivo convencional, que foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos de primeiro uso, identificadas e transportadas em caixas isotérmicas para o laboratório.

Figura 1 – Mapa região urbana de Mossoró-RN – Distribuição dos pontos de coleta em supermercados, em diferentes locais da cidade.



Fonte: Google My Maps e <<http://www.viagemdeferias.com/natal/rio-grande-do-norte/mossoro/>> (canto superior esquerdo) acesso em 17/07/18.

4.3 Análises microbiológicas

Para a análise microbiológica, foram analisadas uma amostra por estabelecimento, onde foi determinado o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes e verificada a presença ou ausência de *Salmonella* sp. Para tanto, primeiramente 25 gramas de cada amostra de alface foram pesados e homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1% para obtenção da primeira diluição (Figura 2).

Figura 2 – Etapas da análise de coliformes em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



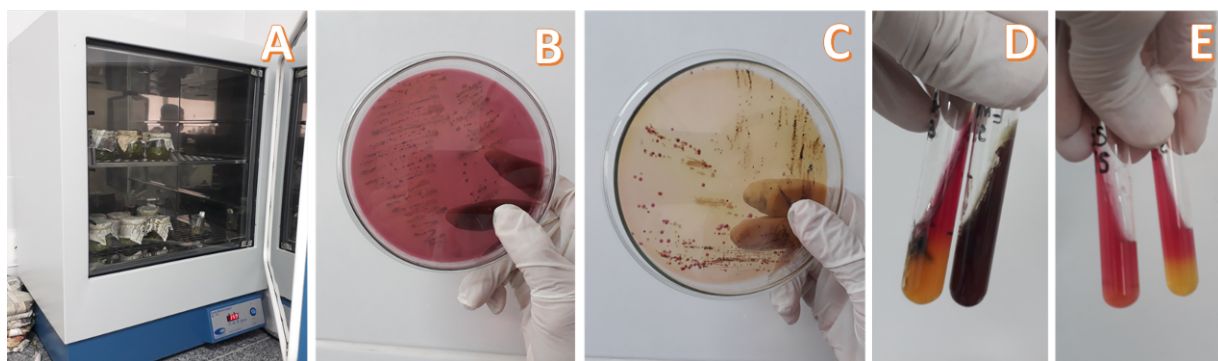
Legenda: A – Pesagem das amostras para posterior homogeneização em água peptonada 0,1%; B – Incubação das amostras em banho-maria; C – Tubos de amostras em caldo LST com presença de gás. Fonte das imagens: Autoria própria.

A análise de coliformes foi realizada pela técnica de NMP, onde foram aplicados testes presuntivo e confirmativo. No primeiro, a partir da primeira diluição, procederam-se diluições seriadas até 10^{-3} . As três diluições foram inoculadas em tubos contendo caldo lauril sulfato triptose (LST) e incubados por 24-48 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em banho-maria. Os tubos que apresentaram produção de gás e/ou turvação foram considerados positivos e passaram para o teste confirmativo por transferência de uma alçada para tubos com caldo verde brilhante bile 2% (VB) e incubados a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24-48h. As amostras com produção de gás e/ou turvação foram consideradas positivas para coliformes totais e foram então inoculadas em caldo *Escherichia coli* (EC) a $45,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24-48h, em banho-maria para quantificação de coliformes termotolerantes. A sequência de tubos positivos de cada diluição foi registrada e os valores de coliformes totais e termotolerantes foram determinados usando tabelas de NMP (SILVA et al., 2007).

Para o teste de *Salmonella* sp., as amostras da primeira diluição (10^{-1}) foram incubadas a 36°C durante 24 horas, em estufa bacteriológica, na etapa de pré-enriquecimento. Posteriormente, foi feito o enriquecimento seletivo, onde alíquotas de 1 mL de cada amostra pré-enriquecida foram transferidas para três caldos diferentes (Rappaport Vassiliadis, Selenite Cystine e Tetrathionate) e incubadas durante 24 horas a 41°C . Em seguida, em plaqueamento diferencial foram inoculados em agar Eosin Methylene Blue (EMB) e agar *Salmonella Shigella* (SS) em placas de Petri e incubadas invertidas a 36°C . Após 24 horas, foi verificada a formação ou não de colônias típicas que passaram por testes bioquímicos confirmatórios,

como descarboxilação de lisina, fermentação de lactose e/ou sacarose e a produção de H₂S (SILVA et al., 2007) (Figura 3).

Figura 3 – Etapas da análise de *Salmonella* sp. em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



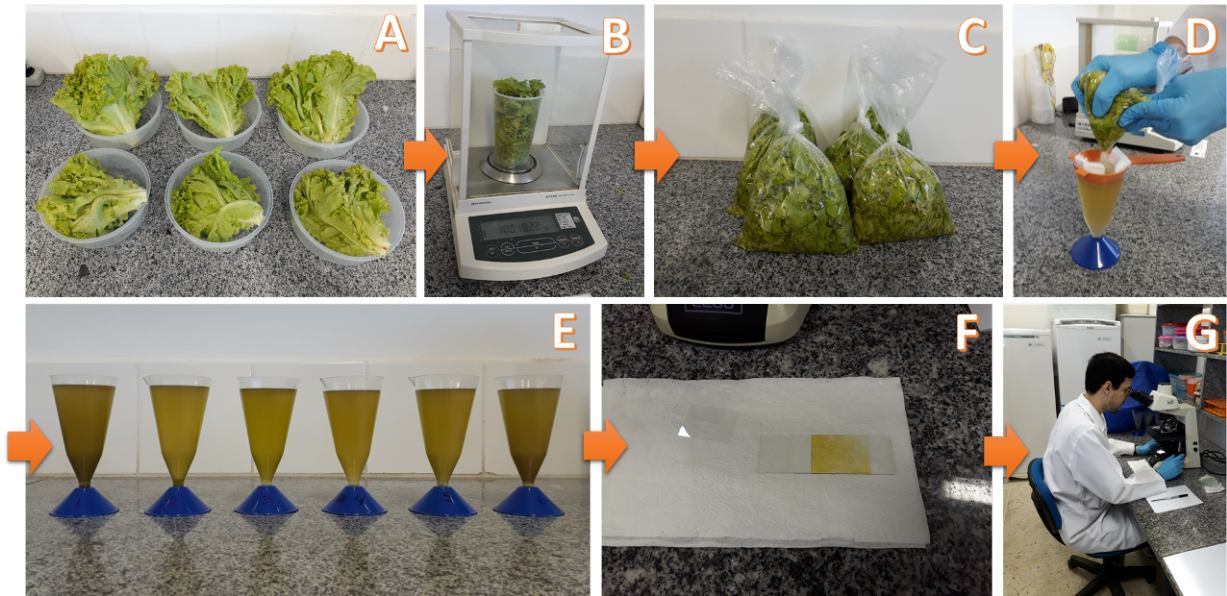
Legenda: A – Incubação em estufa bacteriológica; B – Placa com colônias visíveis em Ágar EMB. C – Placa com colônia visíveis em agar SS; D – Tubos inoculados em meio TSI (amarelo no fundo e vermelho no bisel) e LIA (roxo escuro). E – Tubos inoculados em meio com uréia. Fonte das imagens: Autoria própria.

4.4 Análises parasitológicas

Foi utilizada metodologia descrita por Hoffman; Pons; Janer (1934), com modificações propostas por Takayanagui et al. (2001), onde ocorreram as desfolhas manuais, lavagem e sedimentação espontânea, com pesagem de 100g de cada amostra e homogeneização com 250 mL de água destilada por 30 segundos. O líquido obtido foi filtrado através de gaze cirúrgica dobrada 8 vezes e recolhido em frascos de sedimentação, onde permaneceram em repouso por 24 horas. Após esse período, o líquido sobrenadante foi desprezado e o sedimento resultante foi analisado em triplicata através de exame direto com microscópio ótico, com lâmina corada com solução de lugol, utilizando objetivas de 10 e 40x para pesquisa de ovos ou larvas de helmintos (Figura 4).

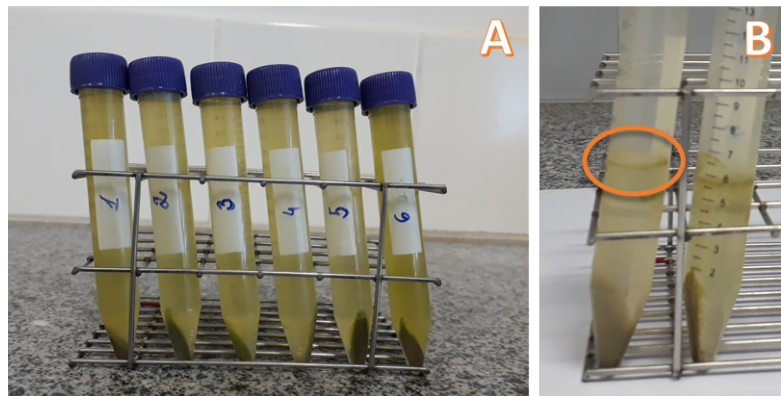
O restante do sedimento foi analisado segundo o método de centrífugo-flutuação de Faust, com adaptações, onde 15 mL do sedimento foram postos em tubo Falcon, centrifugados a 2500 rpm durante um minuto (Figura 5), desprezando o sobrenadante. O sedimento obtido foi então ressuspensionado em solução de sulfato de zinco a 33%, novamente centrifugado e a película sobrenadante resultante examinada em microscópio ótico (40x) para pesquisa de ovos leves e cistos de protozoários (NASCIMENTO; ALENCAR, 2014).

Figura 4 – Etapas da análise parasitológica – método de sedimentação espontânea – em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



Legenda: A – Análise e desfolha das amostras; B – Pesagem; C – Acondicionamento em sacos plásticos para homogeneização; D – Filtração em gaze cirúrgica; E – Sedimentação espontânea em cálices de sedimentação; F – Lâmina montada com o sedimento; G – Leitura de lâminas em microscópio óptico. Fonte das imagens: Autoria própria.

Figura 5 – Etapas da análise parasitológica – método de centrifugo-flutuação – em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



Legenda: A – Tubos centrifugados com o restante do sedimento da sedimentação espontânea; B – Tubos centrifugados com adição de solução de sulfato de zinco 33,3%, com detalhe para a película sobrenadante. Fonte das imagens: Autoria própria.

4.5 Avaliação das condições higiênico sanitária dos estabelecimentos

As bancas de feira livre e os supermercados estudados tiveram suas áreas públicas analisados visualmente, de forma qualitativa, quanto as boas práticas em serviços de

alimentação. Foram observadas as condições físicas e higienização das instalações, móveis e utensílios conforme disposto na Resolução nº 216/2004 (BRASIL, 2004).

4.6 Análise estatística

Os dados categóricos foram analisados aplicando o teste χ^2 e teste exato de Fisher, sendo considerado o nível de significância de 5%. Os dados foram analisados em planilha eletrônica e os testes executados no programa PAST v2.17 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises microbiológicas

Verificou-se que 100% (12/12) das amostras de alface analisadas apresentaram contaminação por coliformes totais, enquanto que 25% (03/12) apresentaram coliformes termotolerantes em contagem acima de 100 NMP/g, sendo 16,7% (01/06) das amostras de bancas de feira livre e 33,3% (02/06) de supermercados, entretanto não houve diferença significativa na qualidade microbiológica entre os dois locais de comercialização ($p=0,505$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados das análises microbiológicas em alfaces de supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN (NMP/g).

Amostra	Coliformes Totais		Coliformes Termotolerantes	
	Feira livre	Supermercado	Feira livre	Supermercado
1	>1100	>1100	20	120
2	>1100	21	23	<3,0
3	>1100	>1100	120	150
4	>1100	>1100	20	9,2
5	>1100	93	20	15
6	>1100	>1100	23	35

Fonte: Autoria própria.

A contagem de coliformes a 35°C variou entre 21 e >1100 NMP/g nas amostras dos estabelecimentos selecionados, sendo máxima (>1100 NMP/g) em todas as provenientes de bancas de feira livre. Apesar de expressivos, a detecção destes coliformes em água e alimentos não representa necessariamente contaminação fecal, uma vez que os microorganismos desse grupo têm capacidade de colonização ambiental, podendo ser encontrados na água, solo, vegetação, insetos, dentre outros (MARTIN et al., 2016).

A detecção de coliformes totais indica falhas nas condições higiênicas de produção do alimento, enquanto que os coliformes termotolerantes são utilizados como indicadores da qualidade sanitária do alimento, indicando a presença de *Escherichia coli* (SOUSA, 2006), único indicador confiável de contaminação fecal (MARTIN et al., 2016).

Os níveis de coliformes totais encontrados foram semelhantes aos obtidos em estudos desenvolvidos em mercados públicos de Maceió (Alagoas) (SILVA et al., 2005) e feiras livres

de Vitória (Espírito Santo) (FERREIRA; ALVARENGA; SÃO JOSÉ, 2015). Entretanto, inexitem parâmetros ou limites estabelecidos para detecção de coliformes totais na legislação brasileira. A Resolução nº 12/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), estabelece limites microbiológicos de até 100 NMP/g de coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* sp. nas hortaliças *in natura*.

Quanto aos coliformes termotolerantes, verificou-se que 25% (03/12) das amostras de alface analisadas apresentaram contagem acima do permitido. As fontes de contaminação de frutas e vegetais por agentes patogênicos são inúmeras, e podem ser classificadas em pré-colheita e pós-colheita (BEUCHAT, 1995).

Os fatores pré colheita incluem contaminação no solo, água de irrigação, esterco de animais compostado inadequadamente, presença de animais domésticos ou selvagens na plantação, poeira, insetos ou ainda a manipulação humana (MAFFEI et al., 2016; SSEMANDA et al., 2018). Já entre os fatores pós-colheita podem ser citados a contaminação de equipamentos de colheita / processamento / embalagem, veículos de transporte, água de enxague, armazenamento inadequado, contaminação cruzada com outros alimentos, e novamente, a manipulação humana (agricultor, comerciante e consumidor) (BEUCHAT, 1995; TEFERA et al., 2018).

Outros estudos também já demonstram a contaminação da alface por micro-organismos: em Teresina (Piauí) 60% das amostras apresentavam alto teor de coliformes termotolerantes (BARBOSA et al., 2016) e em Natal (Rio Grande do Norte) a contaminação foi de 83,3% em amostras de hortaliças folhosas, sendo a alface a mais contaminada (NASCIMENTO; ALENCAR, 2014). Números diferentes foram obtidos em propriedades rurais do Vale do Taquari (Rio Grande do Sul), onde não foram detectadas amostras com contaminação acima do limite estabelecido (SCHERER et al., 2016).

Em relação à *Salmonella* sp., foi constatada sua ausência em todas as amostras analisadas. Esses dados corroboram com os de Abreu et al., (2010); Gomes Neto et al., (2012); e Santana et al., (2006), que também não diagnosticaram este patógeno em alfaces de diferentes sistemas de cultivo agrícola. Ainda assim este patógeno merece destaque por ser um dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

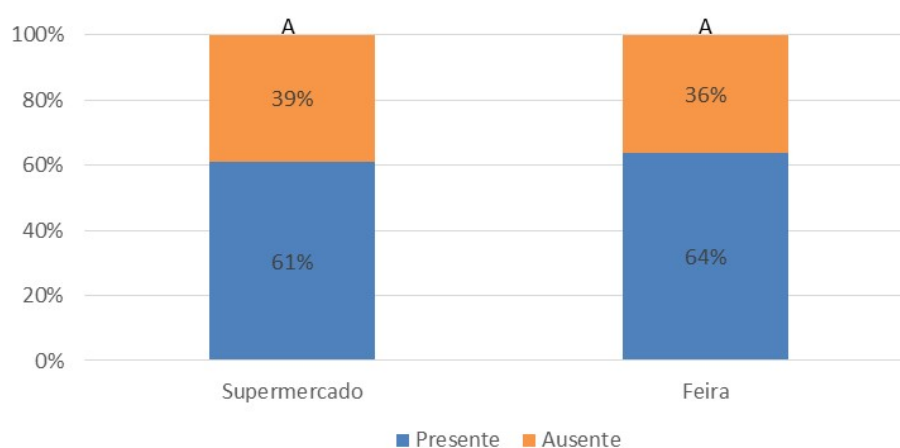
Entretanto, a presença de *Salmonella* sp. em folhas de alface já vem sendo demonstradas em diversos estudos no Brasil e no mundo (ARBOS et al., 2010; BARBOSA et al., 2016; MAFFEI et al., 2016; SCHERER et al., 2016). Traoré et al., (2015) verificou a contaminação de 50% das amostras de alface em Ouagadougou, Burkina Faso, e associou sua

presença com a concomitante positividade de 23% das amostras de águas superficiais e 24% dos peixes analisados, sugerindo que a contaminação das hortaliças pode ocorrer pela água usada na irrigação e também na utilização de esterco animal como fertilizante.

5.2 Análises parasitológicas

Verificou-se de forma geral que 62,5% (45/72) das amostras de alface analisadas estavam contaminadas com parasitos, estando em desacordo com regulamentação brasileira, que através da Resolução-CNNPA nº 12/1978 preconiza a inexistência desse achado em hortaliças *in natura* (BRASIL, 1978). Quanto aos locais de comercialização, 61,1% (22/36) das amostras de supermercados apresentaram contaminação, enquanto 63,9% (23/36) das amostras de bancas de feira-livre da cidade de Mossoró-RN estavam contaminadas com formas transmissíveis de enteroparasitos (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Frequência de contaminação parasitária em alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



Legenda: Letras acima do gráfico representam igualdade estatística. Para essa análise realizou-se o teste do qui-quadrado, $\chi^2 = 0,059259$ e valor $p = 0,80767$, para o nível de significância igual a 5%.
Fonte: Autoria própria.

Um dos fatores que podem influenciar a taxa de contaminação é o local de comercialização. As feiras livres, devido à frequente falta de condições estruturais e de higiene, ocasionam uma maior exposição dos alimentos aos patógenos contaminantes, podendo comprometer a qualidade dos alimentos e colocar em risco a saúde dos consumidores (ESTEVEES; FIGUEIRÔA, 2012).

A frequência de formas transmissíveis de enteroparasitos encontradas está de acordo com estudos de Silva et al., (2017), com 85,4% de alfaces de serviços de alimentação *fast food* em Crato e Barbalha (Ceará) contaminadas, e Silva; Santos; Ferreira (2017), que encontraram 90% de amostras de feira livre com contaminação parasitária em Governador Valadares (Minas Gerais).

Apesar da semelhança nesses números, a frequência de achados de enteroparasitos em hortaliças é bastante variável na literatura. Estudo de Beletini; Takizawa; Takizawa (2014), por exemplo, apresentou somente 11,6% de positividade nas alfaces analisadas de Cascavel (Paraná). Entretanto, apesar da variação, fica demonstrado o potencial risco de transmissão de doenças que esta hortaliça oferece a saúde da população, principalmente se consumida na forma *in natura*, sem cuidados no preparo.

No presente estudo não houve diferença significativa entre os achados parasitológicos entre os estabelecimentos comerciais ($p=0,808$). Diferente de Nascimento; Alencar (2014), que mostrou que entre as alfaces analisadas que apresentaram qualidade insatisfatória para consumo, 30% eram de supermercados e 70% provenientes de feiras livres, sendo a alface a hortaliça com maior carga parasitária. Dados semelhantes foram obtidos por Vieira et al. (2013), onde 20% das amostras de supermercados encontravam-se contaminadas por enteroparasitos, enquanto 38% das vendidas em feiras livres estavam positivas, com diferença estatisticamente significativa.

Dentre as amostras contaminadas, verificou-se ainda que 73,3% (33/45) estavam contaminadas com apenas uma espécie de enteroparasito, enquanto que 26,6% (12/45) apresentavam parasitismo múltiplo. Quando analisadas por estabelecimento, foi visto que a maior parte das amostras contaminadas por mais de uma espécie de parasito eram provenientes de bancas de feira livre (30,4%), em comparação com 22,7% das amostras de supermercados ($p=0,559$).

Na feira livre foram notórias as falhas estruturais e de higiene característica de país em desenvolvimento. Apesar de ser um comércio consolidado na cidade, na zona urbana e com espaço próprio e definido, a falta de investimento e fiscalização constante contribuem para práticas não adequadas.

Nesse sentido foi possível observar várias inconformidades quanto as boas práticas em serviços de alimentação, dispostas na Resolução nº 216/2004 (BRASIL, 2004). As bancas da feira livre analisadas eram em maioria de estrutura fixa, porém algumas estavam dispostas de forma improvisada, com estrutura de madeira removível, forradas com lonas ou materiais não impermeáveis e de difícil higienização (Figura 6). Foi possível observar também lixeiras

abarrotaadas e lixo disposto no chão, o que favorece o aparecimento de vetores e pragas (FERREIRA; ALVARENGA; SÃO JOSÉ, 2015). Adicionalmente os comerciantes manipulavam dinheiro e alimentos concomitantemente, sem antissepsia das mãos.

Figura 6 – Feira livre em Mossoró-RN.



Legenda: A – Aspecto geral dos corredores da feira livre; B – Lixo acumulado no chão, ao lado dos alimentos expostos ao sol; C – Banca improvisada de venda de alface, com superfície irregular e lixo no chão próximo. Fonte: Autoria própria.

Estrutura precária e manipulação inadequada, associadas à livre exposição ao sol, insetos e poeira propiciam a proliferação de micro-organismos patogênicos, podendo promover contaminações e disseminação de doenças de origem alimentar (FERREIRA; ALVARENGA; SÃO JOSÉ, 2015). Infelizmente esse ambiente inadequado em feiras livres é situação rotineira no Brasil, o que compromete a qualidade e segurança dos alimentos oferecidos a população (CAVALCANTI et al., 2014).

Já os supermercados, em hipótese apresentam melhores condições estruturais e de controle sanitário sobre os alimentos. Apesar disso, não houve diferenças significativas em relação a contaminação microbiológica e parasitológica entre estes estabelecimentos e bancas de feira livre. Nos supermercados visitados não foram observadas inadequações nas instalações públicas, a maioria apresentava equipamentos, móveis e utensílios limpos e hortaliças sob condições controladas de temperatura. Entretanto foram verificadas exceções como na Figura 7.

Figura 7 – Condições de venda de hortaliças em supermercados de Mossoró-RN.



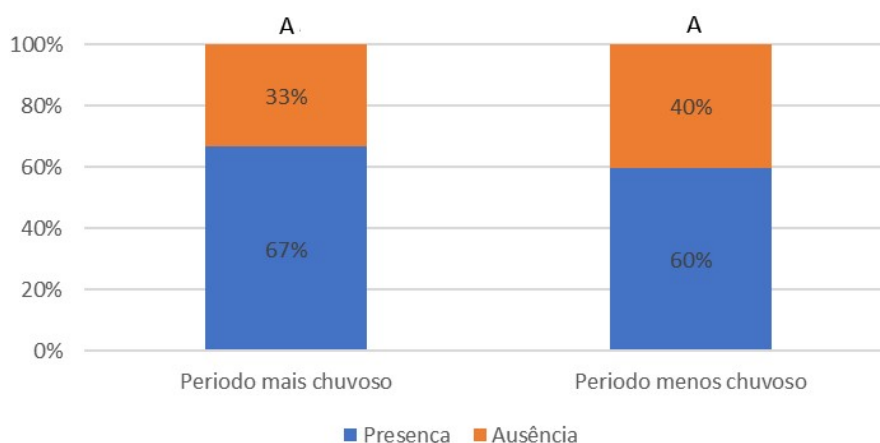
Legenda: A – Prateleiras de supermercados com hortaliças expostas a venda em condições adequadas. B – Prateleiras de supermercados com sujidades aparentes. C – Promoção de hortaliças em exposição inadequada, sem controle de temperatura e com possibilidade de contaminação cruzada com outros alimentos.

Outro fator que pode estar relacionado a taxa de contaminação dos vegetais é a forma de cultivo, já que a alface pode ser cultivada pelos métodos convencional, orgânico e hidropônico, sendo que os primeiros, realizados diretamente no solo, ficam mais expostos à contaminação por micro-organismos e estruturas parasitárias (DRISSNER; ZUERCHER, 2014). Neste estudo todas as amostras de alface analisadas foram provenientes de culturas tradicionais, entretanto, alguns estudos já desenvolvidos que tentaram associar a qualidade microbiológica e parasitológica em relação aos tipos de cultivo de alface das hortaliças não evidenciaram diferenças significativas de contaminação (BARBOSA et al., 2016; GOMIERO, 2017).

As chuvas também tem potencial para influenciar na contaminação, entretanto este estudo não detectou diferença significativa quando comparados os totais de parasitas encontrados nas amostras durante o período menos chuvoso (dezembro/2017 – março/2018), e o período maior média pluviométrica (abril/2018) na região de Mossoró ($p=0,537$) (Gráfico 2) (EMPARN, 2018). As gotas de água ao cair no solo, podem fazer com que partículas carreando sujidades e estruturas parasitárias sejam respingadas nas plantas e acabem se alojando entre as folhas da alface (ARBOS et al., 2010; TEFERA et al., 2018). Simões e

colaboradores (2001) demonstraram em seu estudo que os parasitos foram significativamente mais frequentes em hortaliças na estação chuvosa, associando a chuva à sobrevivência de parasitas em hortaliças.

Gráfico 2 – Frequência de amostras de alface contaminadas com enteroparasitos em relação ao período chuvoso de Mossoró-RN.



Legenda: Letras acima do gráfico representam igualdade estatística. Para essa análise realizou-se o teste do qui-quadrado, $\chi^2 = 0,38095$ e valor $p = 0,53709$, para o nível de significância igual a 5%. Fonte: Autoria própria.

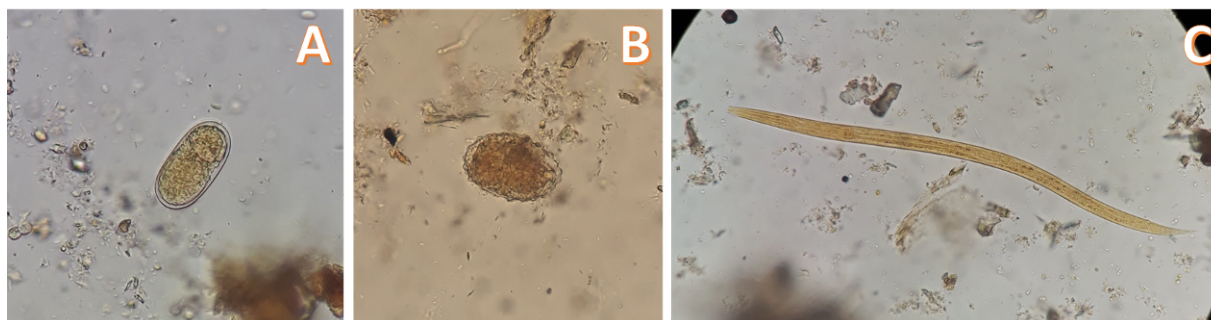
Quanto aos parasitos patogênicos diagnosticados (Tabela 2), as maiores frequências se deram aos ancilostomídeos com 40,3% (n=29) e *Strongyloides* sp. com 29,2% (n=21), seguido de *Ascaris* sp. 1,4% (n=1) e *Entamoeba histolytica/dispar* 1,4% (n=1) (Figura 8).

Tabela 2 – Frequência de amostras de alface de supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN com parasitas e outros contaminantes.

Parasitos	Supermercados n (%)	Feira Livre n (%)	Total n (%)	p
Ancilostomídeos	15 (20,8%)	14 (19,4%)	29 (40,3%)	0,810
<i>Strongyloides</i> sp.	8 (11,1%)	13 (18,1%)	21 (29,2%)	0,195
<i>Ascaris</i> sp.	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)	1
<i>Endoilex nana</i>	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)	1
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)	1
<i>Entamoeba coli</i>	0	2 (2,8%)	2 (2,8%)	0,493
Larvas de vida livre	4 (5,6%)	14 (19,4%)	18 (25,0%)	0,013*
<i>Oesophagostomum</i> sp.	1 (1,4%)	11 (15,3%)	12 (16,7%)	0,003*
Inseto	1 (1,4%)	13 (18,1%)	14 (19,4%)	0,001*
Protozoário ciliado	1 (1,4%)	2 (2,8%)	3 (4,3%)	1

Legenda: * Significância estatística ($p < 0,05$). Fonte: Autoria própria.

Figura 8 – Parasitos patogênicos encontrados em amostras de alface comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



Legenda: A – Ovo de ancilostomídeo; B – Ovo de *Ascaris* sp.; C – Larva de *Strongyloides* sp. Fonte: Autoria própria.

A alta prevalência de contaminações por ancilostomídeos e *Strongyloides* sp. nesse estudo podem ser consequência de adubação orgânica (FERNANDES et al., 2015). A pecuária e acesso de animais às terras agrícolas também representam uma potencial forma de contaminação das lavouras, podendo contribuir para a disseminação de patógenos (DRISSNER; ZUERCHER, 2014). Estudos utilizando técnicas moleculares já relataram a ligação entre os elos da cadeia epidemiológica de animais domésticos, seres humanos e legumes na cadeia de transmissão de enteroparasitos (COLLI et al., 2015).

Infecções por ancilostomídeos em humanos adultos normalmente são assintomáticas, mas podem causar erupções cutâneas, dor abdominal, sangue nas fezes, anemia, deficiências de vitaminas e atrasos no desenvolvimento (SAHIMIN et al., 2017). Ancilostomídeos zoonóticos, particularmente os caninos e felinos, normalmente não desencadeiam infecções mais sérias que a síndrome de larva migrans (LOUKAS et al., 2016).

Já a estrogiloidíase, causada pelo *Strongyloides stercoralis* é normalmente assintomática em sua fase crônica, mas em pessoas imunodeficientes pode levar a complicações sérias como a hiperinfecção, desencadeando lesões gastrointestinais, pulmonares e até sepse (NUTMAN, 2017).

Outro helminto encontrado foi *Ascaris* sp. Apesar da baixa prevalência nas amostras analisadas (1,4%), a ascariíase merece destaque por ser considerada a helmintíase mais comum do mundo (CORVINO; BHIMJI, 2017). Muitos autores relatam a contaminação de hortaliças com ovos de *Ascaris lumbricoides*, que ocorre provavelmente pela irrigação de hortas com água servida (ESTEVES; FIGUEIRÔA, 2012; BARBOSA et al., 2016; BELETINI; TAKIZAWA; TAKIZAWA, 2014). A infecção por *A. lumbricoides* pode ocasionar sintomas clínicos dependente do número de parasitos presentes no hospedeiro,

podendo haver desde infecções assintomáticas até casos graves com obstrução do lúmen intestinal (NEVES et al., 2016).

Estudo brasileiro de Gomes Neto et al. (2012), mostrou números semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde diagnosticou 70% de contaminação por *Strongyloides stercoralis* nas amostras de alface orgânica de João Pessoa (Paraíba), além de *Entamoeba coli* e *Endolimax nana* que foram os protozoários mais prevalentes nas amostras analisadas. Já estudos internacionais em vegetais crus não lavados, incluindo alface, mostraram números diferentes, com baixas taxas de contaminação por ancilostomídeos (2,9%) no Iram (ROSTAMI et al., 2016), enquanto que no Sudão foram baixas as frequências de *Strongyloides stercoralis* (8,6%) e ovos de ancilostomídeos (5,7%) além de maiores prevalências de *E. histolytica/dispar* (42,9%) e *G. lamblia* (22,9%) (MOHAMED et al., 2016).

As diferenças de frequência entre os helmintos transmitidos pelo solo nos estudos citados podem ocorrer devido a diferenças regionais, variações nas técnicas de análises, tipos de água usada na irrigação além dos métodos de manuseio pós-colheita dessas hortaliças (MOHAMED et al., 2016). Relata-se ainda dificuldades na identificação entre espécies devido a semelhanças morfológicas entre os ovos e larvas de ancilostomídeos, *Strongyloides* sp. e outros nematoides (SIMÕES et al., 2001; SAHIMIN et al., 2017) de animais ou de vida livre.

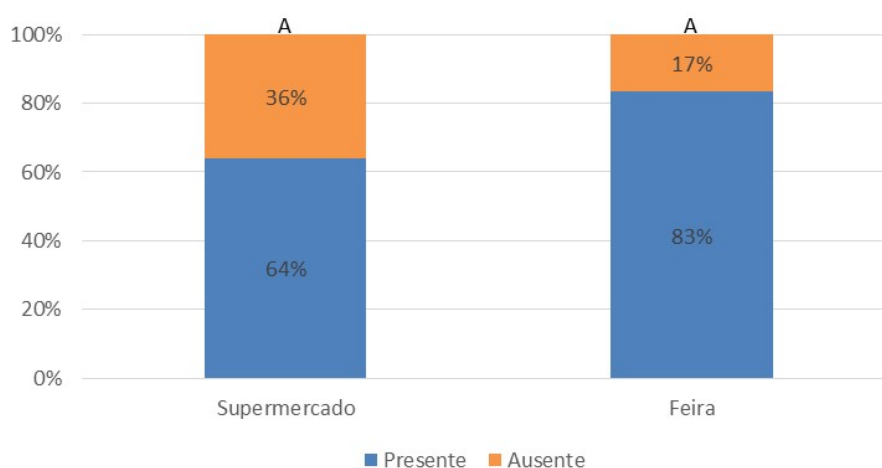
Em relação aos protozoários, no presente trabalho foram encontrados cistos de *Entamoeba histolytica/dispar* (1,4%), *Endolimax nana* (1,4%) e *Entamoeba coli* (2,8%). A presença desses agentes biológicos pode estar relacionada a água utilizada na irrigação, que pode ser veiculadora de formas evolutivas infectantes de protozoários, larvas e ovos de enteroparasitos (ALVES; CUNHA NETO; ROSSIGNOLI, 2013). Nesse sentido, as hortaliças folhosas são facilmente contaminadas por conterem maior superfície de contato, folhas justapostas e flexíveis que favorecem o acúmulo de resíduos e água, além de serem cultivadas diretamente em contato com o solo, que também facilita a contaminação por microorganismos (ARBOS et al., 2010; TEFERA et al., 2018).

E. histolytica/dispar tem grande potencial patogênico pois causa a amebíase, doença de grande impacto em saúde pública, ocasionando cerca de 100 mil óbitos por ano no mundo (NEVES et al., 2016). A amebíase pode apresentar-se assintomática, intestinal ou extraintestinal dependendo da virulência da cepa, causando dores abdominais, colites diarreicas, e podendo gerar danos teciduais graves com formação de abscessos hepáticos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; PRAKASH; BHIMJI, 2017).

Já *E. nana* e *E. coli* não são patogênicos, entretanto são importantes por compartilhar as mesmas vias de transmissão da *E. histolytica* (BARNABÉ et al., 2010). Outros autores relatam maiores achados em relação aos protozoários, como Mohamed et al., (2016) que detectou altas prevalências de *E. histolytica/dispar* (42,9%), *G. lamblia* (22,9%) e *E. coli* (14,3%), sendo os vegetais folhosos (alface e agrião) os mais contaminados.

Quando contabilizados todos os parasitas, larvas e outros contaminantes físicos, verificou-se 73,6% (53/72) das amostras de alface analisadas apresentavam alguma contaminação. Em relação aos locais de comercialização, 63,9% (23/36) das amostras de supermercados apresentaram contaminantes, enquanto 83,3% (30/36) das amostras de bancas de feira-livre da cidade de Mossoró-RN estavam contaminadas, não havendo entretanto, diferença significativa na aquisição da alface entre estes locais ($p=0,061$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Frequência de amostras de alface de supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN com parasitas larvas e outros contaminantes.



Legenda: Letras acima do gráfico representam igualdade estatística. Para essa análise realizou-se o teste do qui-quadrado, $\chi^2= 3,5035$ e valor $p= 0,06124$, para o nível de significância igual a 5%. Fonte: Autoria própria.

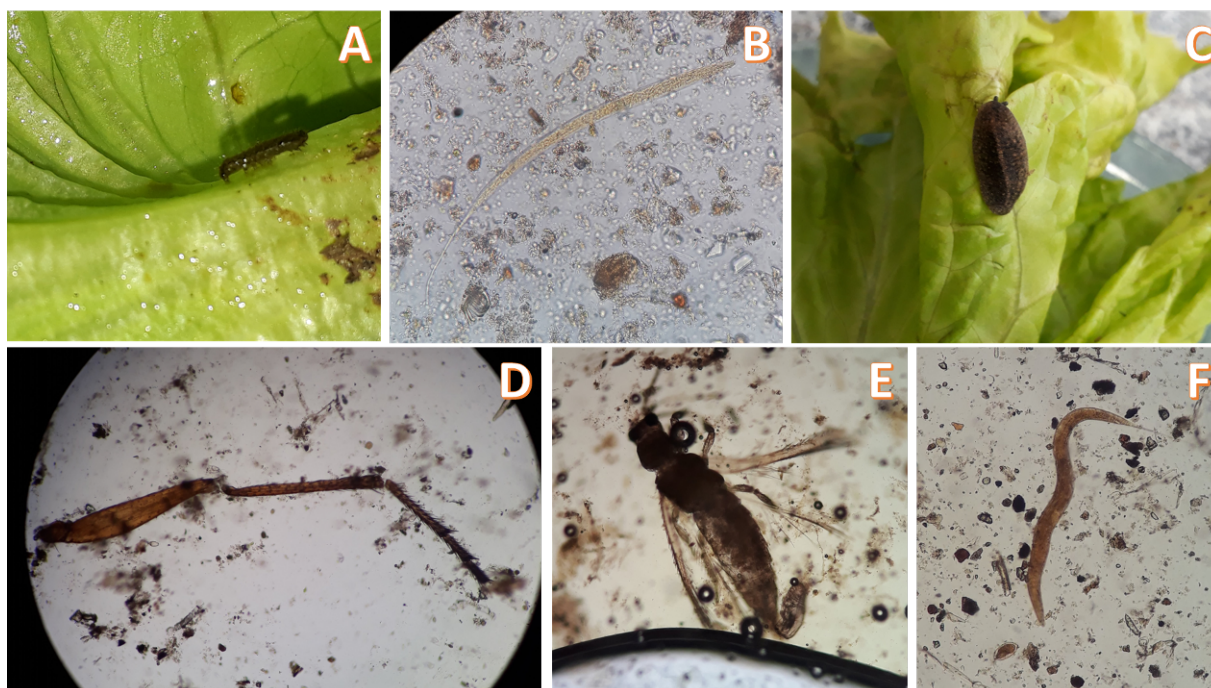
Em amostras das bancas de feira livre foram encontradas sujidades aparentes, inclusive partículas de solo (Figura 9). Nas análises executadas foram encontrados ainda minhocas, lesmas e pequenos insetos e ácaros contaminantes na microscopia, além de larvas de *Oesophagostomum* sp. e outras larvas de nematoides de vida livre sem identificação (Figura 10), que sugerem contaminação por fezes de animais de produção, possivelmente em sua utilização como adubo.

Figura 9 – Sujidades aparentes em alface comercializada em bancas de feira livre da cidade de Mossoró-RN.



Legenda: A – Sujidades nas folhas externas da hortaliça; B – Sujidades na base, parte interna das folhas da alface. Fonte: Autoria própria.

Figura 10 – Achados macroscópicos e microscópicos na análise de alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



Legenda: A – Michoca; B – Larva de *Oesophagostomum* sp.; C – Lesma; D – Perna de inseto; E – Inseto; F – Larva não identificada. Fonte: Autoria própria.

As frequências de achados de insetos, *Oesophagostomum* sp. e larvas de vida livre foram significativamente maiores nas amostras compradas nas bancas da feira livre ($p < 0,05$), devido provavelmente a utilização inadequada de adubação orgânica, além disso, citam-se também às falhas estruturais e exposição inadequada nestes locais de comercialização

(FERREIRA; ALVARENGA; SÃO JOSÉ, 2015). As amostras de supermercados mostravam-se aparentemente ser mais limpas, por serem possivelmente lavadas antes de serem postas a venda.

Foram encontrados também protozoários ciliados, semelhantes a espécies do gênero *Balantidium* (Figura 11). Estes podem ser encontrados em numeroso hospedeiros vertebrados, sendo que a espécie que parasita o porco é morfologicamente indistinguível da que contamina o homem (REY, 2017). *Balantidium coli* é o maior dos protozoários parasitas do homem, porém são raros os registros na literatura médica. Sua sintomatologia pode variar de casos assintomáticos a quadros desintéricos crônicos, determinando lesões do tipo necrótico semelhantes a amebíase (REY, 2017). Outros estudos já evidenciaram a presença deste protozoário em vegetais *in natura* (BARNABÉ et al., 2010; ALVES; CUNHA NETO; ROSSIGNOLI, 2013).

Figura 11 – Protozoário ciliado, semelhantes a espécies do gênero *Balantidium*, encontrado na análise de alfaces comercializadas em supermercados e bancas de feira livre de Mossoró-RN.



Fonte: Autoria própria.

Neste contexto, fica evidente o risco de transmissão de doenças alimentantes aos seres humanos pelo consumo da alface, devendo esta sempre ser preparada previamente para o consumo, seja por desinfecção ou cocção. Como meio de promover a segurança alimentar no consumo destes produtos, o Ministério da Saúde brasileiro recomenda que a população sempre lave frutas, legumes e verduras com solução clorada antes do consumo *in natura* (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2006). Lavagem comum com água da torneira é ineficiente para reduzir a carga bacteriana das folhas (BENCARDINO; VITALI; PETRELLI, 2018). A aplicação de sanitizantes populares, como o ácido acético e hipoclorito de sódio em folhas de alface são capazes de reduzir a contagem de coliformes termotolerantes para dentro dos limites recomendados pela legislação brasileira (GOMES NETO et al., 2012), sendo o hipoclorito de sódio 1% bem mais eficiente que o ácido acético 6,6%, tanto para a remoção de

parasitas, como também coliformes totais e coliformes termotolerantes (NASCIMENTO; ALENCAR, 2014).

Assim, a alta taxa prevalência de patógenos encontradas evidencia um importante problema de saúde pública, principalmente quando consideramos que a alface é comumente consumida *in natura*. É necessário então, um maior rigor na fiscalização pelos órgãos reguladores e uma maior atenção quanto às boas práticas de produção, visando um maior controle higiênico nos processos de produção, distribuição e comercialização da alface.

6 CONCLUSÕES

Este estudo detectou contaminação parasitária em 62,5% das amostras, e 25% apresentava altas taxas de coliformes termotolerantes, o que está em desacordo com os parâmetros mínimos exigidos. Entretanto foi verificada a ausência de *Salmonella* sp. nas amostras analisadas.

Foram detectadas altas taxas de contaminação parasitária nas bancas de feira livre, além de maiores diferenças quanto a multiparasitismo e sujidades neste local de comercialização. Apesar disso não foram constatadas diferenças significativas quanto à contaminação microbiológica e parasitária entre supermercados e feira livre.

Com base nos resultados obtidos, evidenciou-se a baixa qualidade higiênico-sanitária da alface comercializada em Mossoró e o potencial risco a saúde da população que o consumo desta hortaliça *in natura* oferece.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. M. O. et al. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 108–118, 2010.
- ALMEIDA, I. A. et al. Prevalence of and risk factors for intestinal parasite infections in pediatric patients admitted to public hospitals in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 853–856, 2017.
- ALVES, A. S.; CUNHA NETO, A.; ROSSIGNOLI, P. A. Parasitos em alface-crespa (*Lactuca sativa* L.), de plantio convencional, comercializada em supermercados de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 2, p. 217–229, 2013.
- ANDINO, A.; HANNING, I. Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–16, 2015.
- ARBOS, K. A. et al. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 215–220, 2010.
- BARBOSA, V. A. A. et al. Comparação da contaminação de alface (*Lactuca sativa*) proveniente de dois tipos de cultivo. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 2, p. 231–242, 2016.
- BARNABÉ, A. S. et al. Análisis comparativo de los métodos para la detección de parásitos en las hortalizas para el consumo humano. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 62, n. 1, p. 6–11, 2010.
- BELETINI, L. F.; TAKIZAWA, L. H. H.; TAKIZAWA, M. DAS G. Enteroparasitas em alfaces (*Lactuca sativa*) variedade crespa previamente tratadas com desinfetantes. **Thêma et Scientia**, v. 4, n. 1, p. 150–157, 2014.
- BENCARDINO, D.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D. Microbiological evaluation of ready-to-eat iceberg lettuce during shelf-life and effectiveness of household washing methods. **Italian journal of food safety**, v. 7, n. 1, p. 50–54, 2018.
- BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 2, p. 204–216, 1995.
- BRASIL. ANVISA. Resolução - CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 24 jul. 1978. Seção 1.
- BRASIL. ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 10 jan. 2001. Seção 1.
- BRASIL. ANVISA. Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 16 set. 2004. Seção 1.
- BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 18 set. 2006, Seção 1.

BVENURA, C.; SIVAKUMAR, D. The role of wild fruits and vegetables in delivering a balanced and healthy diet. **Food Research International**, v. 99, p. 15–30, 2017.

CAMA, V. A.; MATHISON, B. A. Infections by Intestinal Coccidia and *Giardia duodenalis*. **Clinics in laboratory medicine**, v. 35, n. 2, p. 423–44, 2015.

CARVALHO, A. I. Determinantes sociais, econômicos e ambientais da saúde. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Ed.). **A saúde no Brasil em 2030 - prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro: população e perfil sanitário [online]**. Rio de Janeiro: Fiocruz/Ipea/Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2013. v. 2, p. 19–38.

CAVALCANTI, C. R. et al. Avaliação e diagnóstico das condições de comercialização de alimentos nas feiras livres no estado da Paraíba. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 3, p. 167–172, 2014.

COLLI, C. M. et al. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

CORVINO, D. L.; BHIMJI, S. Ascariasis. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2017.

DAVID, É. B. et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 103, 2015.

DRISSNER, D.; ZUERCHER, U. Safety of Food and Beverages: Fruits and Vegetables. In: **Encyclopedia of Food Safety**. Elsevier, 2014. p. 253–259.

EMPARN. **Monitoramento Pluviométrico**. Disponível em: <<http://187.60.73.143:8181/monitoramento/monitoramento.php>>. Acesso em: 7 ago. 2018.

ENG, S.-K. et al. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284–293, 2015.

ESTEVES, F.; FIGUEIRÔA, E. Detecção de enteroparasitas em hortaliças comercializadas em feiras livres do município de Caruaru (PE). **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 33, n. 2, p. 38–47, 2012.

EZATPOUR, B. et al. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in Khorramabad, Iran. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 92–95, 2013.

FENG, P. et al. Laboratory Methods - Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: **Bacteriological Analytical Manual (BAM) [Internet]**. U.S. Food and Drug Administration, 2002.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Laboratory Methods - Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: **Bacteriological Analytical Manual (BAM) [Internet]**. U.S. Food and Drug Administration, 2002.

FERNANDES, N. D. S. et al. Avaliação parasitológica de hortaliças: da horta ao consumidor final. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 255, 2015.

FERREIRA, A. B.; ALVARENGA, S. H. F.; SÃO JOSÉ, J. F. B. Qualidade de frutas e hortaliças orgânicas comercializadas em feiras livres. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 4, p. 410–419, 2015.

FERREIRA, A.; CHIARA, V. L.; CAETANO, M. C. Alimentação saudável na adolescência : consumo de frutas e hortaliças entre adolescentes brasileiros. **Adolescencia e Saude**, v. 4, n. 2, p. 48–52, 2007.

FRITTOLI, R. B.; RODRIGUES, L. R. Análise de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. em amostras de hortaliças minimamente processadas. **Revista Científica da FHO|UNIARARAS**, v. 2, n. 2, p. 14–20, 2014.

GOMES NETO, N. J. et al. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 47–51, 2012.

GOMIERO, T. Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues. **Applied Soil Ecology**, v. 123, p. 714–728, 2017.

GREGÓRIO, D. S. et al. Estudo da contaminação por parasitas em hortaliças da região leste de São Paulo. **Science in Health**, v. 3, n. 2, p. 96–103, 2012.

HALL, J. N. et al. Global variability in fruit and vegetable consumption. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 36, n. 5, p. 402–409, 2009.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HAN, Y. et al. Purple lettuce (*Lactuca sativa* L.) attenuates metabolic disorders in diet induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 462–470, 2018.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Brasília-DF: Embrapa (Comunicado Técnico 75), 2009.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **International Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 9, p. 283–298, 1934.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 8, p. 601–606, 2014.

IBGE. **Atlas do censo demográfico 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Normais climatológicas do Brasil**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisclimatologicas>>. Acesso em: 26 out. 2018.

JAIME, P. C. et al. Fatores associados ao consumo de frutas e hortaliças no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 57–64, 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

LELONG, H. et al. Individual and combined effects of dietary factors on risk of incident hypertension. **Hypertension**, v. 70, n. 4, 2017.

LEVINE, D. M.; BERENSON, M. L.; STEPHAN, D. **Estatística: Teoria e Aplicações usando Microsoft Excel em Português**. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 784p

LIMA, D. S. et al. Parasitoses intestinais infantis no nordeste brasileiro: uma revisão integrativa da literatura. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - FACIPE**, v. 1, n. 2, p. 71–80, 2013.

LOUKAS, A. et al. Hookworm infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16088, 2016.

LUDWIG, K. M. et al. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 547–555, 1999.

MAFFEI, D. F. et al. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 99–105, 2016.

MARTIN, N. H. et al. The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1549, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. 1. ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição, 2006. 210p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8ª ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010. 320p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil, 2011-2022**. Brasília-DF: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde, 2011. 160p.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275–278, 2011.

MOHAMED, M. A. et al. Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets

- in Khartoum state, Sudan. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 15, p. 17, 2016.
- MRITUNJAY, S. K.; KUMAR, V. Microbial quality, safety, and pathogen detection by using quantitative PCR of raw salad vegetables sold in Dhanbad City, India. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 1, p. 121–126, 2017.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 873p.
- NASCIMENTO, E. D.; ALENCAR, F. L. S. Eficiência antimicrobiana e antiparasitária de desinfetantes na higienização de hortaliças na cidade de Natal - RN. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 92–106, 2014.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 13^a ed. São Paulo: Atheneu, 2016. 264p.
- NICOLLE, C. et al. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa folium*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 15, p. 2061–2069, 2004.
- NUTMAN, T. B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related Strongyloides species. **Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 263–273, 2017.
- OLIVEIRA, E. S. L.; SILVA, J. S. Índice de parasitoses intestinais nas zonas urbana e rural do município de Caputira - estado de Minas Gerais. **Revista Pensar Acadêmico**, v. 14, n. 2, p. 143–152, 2016.
- ORLANDI, P. A. et al. Parasites and the Food Supply. **Foodtechnology**, v. 56, n. 4, p. 71–81, 2002.
- PRAKASH, V.; BHIMJI, S. **Abscess, Amebic Liver**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2017.
- REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 391p.
- ROBERTSON, L. J. et al. Impacts of globalisation on foodborne parasites. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 37–52, 2014.
- RODRIGUES, R. Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 152–164, 2014.
- ROSTAMI, A. et al. Contamination of commonly consumed raw vegetables with soil transmitted helminth eggs in Mazandaran province, northern Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 225, p. 54–58, 2016.
- SAHIMIN, N. et al. Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: Molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. **Acta Tropica**, v. 173, p. 109–115, 2017.

- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187–194, 2012.
- SANTANA, L. R. R. et al. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 264–269, 2006.
- SCHERER, K. et al. Avaliação bacteriológica e físico-química de águas de irrigação, solo e alface (*Lactuca sativa* L.). **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, n. 3, p. 665–675, 2016.
- SILVA, A. A. V. et al. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de sururu (*Mytella charruana*) e alface (*Lactuca sativa*) comercializados em um mercado público de Maceió-AL. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 36, n. 4, p. 525–529, 2005.
- SILVA, E. M. N. et al. Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 242–245, 2011.
- SILVA, V. G.; SANTOS, G. C.; FERREIRA, V. M. S. Enteroparasitas veiculados em folhas de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na feira livre da cidade de Governador Valadares, Minas Gerais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, p. 1343–1352, 2017.
- SILVA, M. M. C.; COELHO, A. B. Demanda por frutas e hortaliças no Brasil: uma análise da influência dos hábitos de vida, localização e composição domiciliar. **Pesquisa e Planejamento Econômico**, v. 44, n. 3, p. 545–578, 2014.
- SILVA, M. V. et al. Estudo parasitológico de alface (*Lactuca sativa* L.) em alimentos fast food comercializados em festas populares do Cariri. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 28–32, 2017.
- SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água - Editora Blucher**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2007. 535p.
- SIMÕES, M. et al. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 331–333, 2001.
- SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v. 9, n. 1, p. 83–88, 2006.
- SSEMANDA, J. N. et al. Foodborne pathogens and their risk exposure factors associated with farm vegetables in Rwanda. **Food Control**, v. 89, p. 86–96, 2018.
- SUINAGA, F. A. et al. **Desempenho produtivo de cultivares de alface crespa**. 1. ed. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 89), 2013.
- TAKAYANAGUI, O. M. et al. Fiscalização de verduras comercializadas no município de

Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 37–41, 2001.

TANG, G.-Y. et al. Effects of vegetables on cardiovascular diseases and related mechanisms. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 1–25, 2017.

TEFERA, T. et al. Parasite contamination of berries: Risk, occurrence, and approaches for mitigation. **Food and Waterborne Parasitology**, 2018.

TORRES, A. G. Chapter 51 – Intestinal Pathogenic Escherichia coli. In: **Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases**. Elsevier, 2009. p. 1013–1029.

TRAORÉ, O. et al. Prevalence and diversity of Salmonella enterica in water, fish and lettuce in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 151, 2015.

VELHO, P. E. N. F. et al. Larva migrans: a case report and review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 3, p. 167–171, 2003.

VIEIRA, J. N. et al. Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Ciência Médicas Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 45–49, 2013.

WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert**. Geneva: WHO technical report series 916, 2003. v. 916.

ZIBAEI, M. Helminth infections and cardiovascular diseases: toxocara species is contributing to the disease. **Current Cardiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 56–62, 25, 2016.