

EVELYN ROSSE MARY ARNEZ ZERDAS

**AVALIAÇÃO DO USO DE SURFACTANTES NA REMOÇÃO DE *Salmonella*
Enteritidis ADERIDA EM SUPERFÍCIE FOLIAR DA ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2009

EVELYN ROSSE MARY ARNEZ ZERDAS

**AVALIAÇÃO DO USO DE SURFACTANTES NA REMOÇÃO DE *Salmonella*
Enteritidis ADERIDA EM SUPERFÍCIE FOLIAR DA ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

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

APROVADA: 29 de julho de 2009

Prof. Luis Antônio Minim
Co-Orientador

Prof^a Regina Célia Santos Mendonça
(Co-orientadora)

Prof. Wilmer Edgard Luera Peña

Dr. Washington Azevêdo da Silva

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante na minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade em participar do Programa de Pós-Graduação.

À FAPEMIG e ao CNPq pela disponibilização de recursos para esta pesquisa.

Ao professor Nélio José de Andrade, pela orientação, cooperação, cordialidade e principalmente pelo conhecimento transferido.

Aos professores Regina Célia Santos Mendonça, Luis Antônio Minim, Wilmer Edgar Peña, e ao doutor Washington Azevedo Silva, pelas valiosas sugestões para a melhora deste documento.

Ao professor Rolf Puschmann pela amizade, cooperação e ensinamentos.

Ao professor Ivo Ribeiro pela colaboração na análise estatística dos dados.

Aos colegas do laboratório de Higiene Industrial e particularmente a Sílvia Domingues, Dani Lana, Laryssa que auxiliaram nesta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Pós-colheita-DBV, particularmente Franciscleudo.

Aos funcionários do DTA e particularmente ao Pio.

A meus Pais Maria Cruz e Raúl e, especialmente, ao meu avó Felix, pelo infatigável apoio e amor e ao meu tio Jorge, pelo seu exemplo de vida.

Ao José Morgana e meus irmãos Ariel, Patrícia, Ruth, Valentina, Paola e Carla.

Ao Milton, Andrés e Pablo, meu esposo e filhos, pelo amor, alegria e compreensão.

Aos amigos Damião, Cássia, Gloria e Nancy, e particularmente ao Antônio e Gracinha pela suas colaborações.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis	3
2.2 Análise de espécies de <i>Salmonella</i>	4
2.3 Superfície foliar e Adesão bacteriana	5
2.4 Fatores físico-químicos e termodinâmicos que influenciam a adesão bacteriana	6
2.4.1 Teoria de DLVO	6
2.5 Hidrofobicidade	8
2.5.1 Método do Ângulo de Contacto	9
2.5.2 Hidrofobicidade da alface	12
2.6 Efeito dos surfactantes sobre a remoção de células bacterianas	13
2.6.1 Cloreto de Benzalconio (BAC)	15
2.6.2 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	16
2.7 Compostos clorados	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Amostras de alfaces	18
3.2 Microrganismo	18
3.3 Microbiota das alfaces	19
3.4 Determinação da hidrofobicidade	20
3.4.1 Hidrofobicidade de folhas de alfaces	21
3.4.2 Hidrofobicidade da <i>Salmonella</i> Enteritidis	21
3.5 Adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis em folhas de diferentes posições da roseta de alface	22
3.6 Temperatura e tempo na adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis	22

3.7 Eficiência bactericida do cloreto de benzalcônio e do dodecil sulfato de sódio	23
3.8 Planejamento experimental e análise de resultados	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Microbiota	26
4.2 Influência da Temperatura e tempo na adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis	27
4.3 Tipos de superfície foliar de alface e adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis	29
4.4 Hidrofobicidade de <i>Salmonella</i> Enteritidis	30
4.5 Hidrofobicidade foliar versus posição na roseta de alface	31
4.6 Adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis em folhas de diferente posição na roseta da alface	32
4.7 Eficiência bactericida do Cloreto de Benzalcônio (BAC)	34
4.8 Eficiência bactericida do Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	37
4.8.1 Eficiência do SDS versus tempo de contato	38
5 CONCLUSÕES	40
6 REFERÊNCIAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal	10
Figura 2	Estrutura química do Cloreto de Benzalcônio	15
Figura 3	Estrutura Molecular do Dodecil sulfato de Sódio	16
Figura 4	Alface, cultivares Vitória de Santo Antão e Crespa Verônica	18
Figura 5	Efeito temperatura versus tempo na adesão de células sésseis de <i>Salmonella</i> Enteritidis (1×10^4 UFC / mL) na superfície foliar de alface cv.Crespa	28
Figura 6	Microtopografia de folha alface Vitória de Santo Antão por microscopia eletrônica de varredura	30
Figura 7	Figura esquemática da interação de adesão de bactéria hidrofílica com superfícies de alface hidrofóbica e hidrofílica	34
Figura 8	Redução decimal de UFC / cm ² de células sésseis de <i>Salmonella</i> Enteritidis da superfície foliar de alface cv. Crespa com concentrações crescentes de Cloreto de Benzalcônio (BAC) e 10 minutos de contato a 22 °C.....	35
Figura 9	Redução decimal de UFC cm ⁻² de células bacterianas sésseis de <i>Salmonella</i> Enteritidis da superfície foliar de alface cv. Crespa, a diferentes concentrações de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 10 min de contato a 22 °C	38
Figura 10	Influência do tempo de contato na diminuição da população de <i>Salmonella</i> Enteritidis aderida à superfície de alface cv. Verônica Crespa com $1153,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de SDS a 22 °C	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Componentes da tensão de superficial de líquidos a 25 ° C	10
Tabela 2	Microbiota em UFC / g de alface cv. Vitória de Santo Antão cultivada em ambiente protegido e sistema convencional	28
Tabela 3	Adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis sobre superfícies foliares de alface apos de 12 h de contato a 25 °C em suspensão inicial de $1,0 \times 10^5$ (UFC / mL)	29
Tabela 4	Medida dos ângulos de contato e cálculo da tensão interfacial de <i>Salmonella</i> Enteritidis	31
Tabela 5	Ângulos de contato e tensão interfacial de folhas de alface cv. Vitória de Santo Antão	32
Tabela 6	Adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis na a superfície de alface cv. Vitória de Santo Antão em três diferentes posições da roseta	33

RESUMO

ARNEZ ZERDAS, Evelyn Rosse Mary, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Avaliação do uso de surfactantes na remoção de *Salmonella* Enteritidis Aderida em superfície foliar da alface (*Lactuca sativa* L.).** Orientador: Nélcio José de Andrade. Co-orientadores: Regina Célia Santos Mendonça e Luis Antônio Minim.

Surfactantes de natureza diversa vêm sendo avaliados nas suas capacidades bactericidas como alternativas à utilização do cloro na sanitização de vegetais. Não obstante, a interação superfícies-microrganismos-surfactantes deve ser melhor compreendida, visando aprimorar os procedimentos de sanitização. Na presente pesquisa, foram avaliadas, em folhas de alface, as ações do cloreto de benzalcônio (BAC) (300 a 2000) mg·L⁻¹ e do dodecilssulfato de sódio (SDS) (600 a 3500) mg·L⁻¹ e o tempo de contato, na inativação das células sésseis de *Salmonella* Enteritidis. O efeito do tempo, e a temperatura no processo de adesão, a hidrofobicidade do microorganismo e a superfície foliar com diferente rugosidade e a posição na roseta de alface foram também avaliadas. Os resultados mostraram que o caráter hidrofóbico-hidrofílico das superfícies influem significativamente ($p \leq 0,05$) na adesão de *Salmonella* Enteritidis, e que o $\Delta G_{adesão}$ foi favorável para folhas externa, interna e intermediária da roseta, em magnitudes diferentes. O número de células de *Salmonella* Enteritidis aderidas na superfície da folha intermediária (7,0 log UFC /cm²) foi, significativamente, menor ($p \leq 0,05$) do que as folhas externa (7,51 log UFC/ cm²) e internas (7,75 log UFC/cm²). As soluções de 1200 mg·L⁻¹ de BAC e de 600 mg·L⁻¹ de SDS, a 25 °C e 10 minutos de contato, atingiram reduções decimais de 1,2 e 0,83 log UFC/cm², respectivamente, e significativamente ($p < 0,05$) menores que as 1,8 reduções decimais atingidas com 200 mg·L⁻¹ de dicloroisocianurato de

sódio. Incrementos no tempo de contato entre 5 e 60 minutos, da concentração mais eficiente de SDS ($1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nas reduções decimais. A adesão de *Salmonella* Enteritidis sobre a superfície de alface foi influenciada de forma aditiva pelo tempo 5 a 90 minutos, e a temperatura 5 a 25°C , não havendo interação entre esses fatores. As soluções de BAC e SDS apresentaram eficiência limitada na remoção de *Salmonella* Enteritidis, não atingindo três reduções decimais requeridas para serem consideradas eficientes no controle de bactérias sésseis. Soluções de SDS podem ser alternativas para a utilização como detergente nos procedimentos de higienização de alface, desde que aspectos toxicológicos e sensoriais sejam levados em consideração.

ABSTRACT

ARNEZ ZERDAS, Evelyn Rosse Mary, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Evaluation of the use of surfactants in the removal of *Salmonella* Enteritidis adhered on the surface of lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaves.**
Adiviser: Nélio José de Andrade. Co-Advisers: Regina Célia Santos Mendonça and Luis Antônio Minim.

Surfactants have been evaluated in their antimicrobial activity as an alternative to chlorine compounds to sanitize vegetable. However, the interactions between surfaces –microorganisms- surfactants should be better understand, improving the sanitizing procedures. The efficiency of solutions of benzalkonium chloride (300 to 2000 mg·L⁻¹ of BAC) and sodium dodecil sulphate (600 – 3500 mg · L⁻¹ de SDS) and the contact time in the inactivation of sessile of *Salmonella* Enteritidis in the lettuce leaves surfaces was evaluated. The effect of time and temperature in adherence process, and the hydrophobicity of the microorganism and the leaves surfaces with different roughness and position in the rosette of the lettuce also were evaluated. The results showed that the hydrophobic-hydrophilic characteristics of surface affect ($p < 0.05$) the adherence of the *Salmonella* Enteritidis. The $\Delta G_{\text{adhesion}}$ was favorable for internal and external leaves and for intermediary leaves in the rosette, in different magnitudes. The number of *Salmonella* Enteritidis cells adhered to lettuce leaves (7.0 log cfu·cm⁻²) was lower than the microbial numbers found in the external (7.51 log UFC / cm²), and internal leaves (7.75 log UFC / cm²). Solutions of 1200 mg·L⁻¹ de BAC and 600 mg·l⁻¹ of SDS, a 25 °C e 10 min contact reached 1.20 and 0.83 decimal reduction (DR) in the *S. Enteritidis* population, and these values were lower ($p < 0.05$) than the obtained by 200 mg·L⁻¹ of free available chlorine prepared from sodium dychloroisocianurate (1.8 DR). Increases in the contact time (5 to 60 minutes)

for solutions more efficient of SDS did not present differences ($p \leq 0.05$) in the DR numbers. The adherence of *S. Enteritidis* to lettuce leaves was affected in an additive form by time 5 to 90 min, and temperature 5 a 25 °C, without interaction between the factors, although temperature showed higher effect in the adherence process. The BAC and SDS solutions showed a limited efficiency, because they did not reach 3 DR, as recommended sessile cells. The SDS solutions could be an alternative to be used as a detergent in the cleaning and sanitizing process for lettuces. However, the toxicological and sensorial aspect of this application should be taken in consideration.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a alface (*Latuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa de maior consumo “*in natura*”. Entre os tipos diferentes de alface, a de folha crespa é mais consumida, ocupando 61% da demanda total do mercado.

As hortaliças frescas, entre elas a alface, foram identificadas como veículos de bactérias patogênicas, causadoras de doenças entéricas. Isto está relacionada à capacidade das bactérias patogênicas de se aderirem à superfície dos produtos frescos, incidindo significativamente na indústria alimentar.

As bactérias patogênicas causam contaminação em diferentes estágios da cadeia produtiva. A origem da contaminação é atribuída às fontes diversas entre elas, uso de esterco cru, água de irrigação e, ou lavagem contaminadas, presença de dejetos de animais na área de produção, e contaminação por manipulação na pós-colheita e comercialização (BEUCHAT, 2000).

No elo comercial, como feiras livres e mercados, tem-se relatado contaminação com coliformes fecais acima de 10^2 NMP/g, limite máximo estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para alimentos frescos *in natura*. As espécies frequentemente encontradas foram *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter geraoviae*, *Enterobacter agglomerans*.

Soluções de cloro, em concentrações de 50 a 200 mg·L⁻¹, têm sido utilizadas para sanitizar vegetais à escala comercial, embora esse tratamento reduza somente de 1 a 2 ciclos logarítmicos, no caso das células sésseis da *Salmonella sp.* Por outro lado, tales compostos ao reagir com o material orgânico fresco levam à formação de

compostos organoclorados carcinogênicos como os trihalometanos e cloraminas (MORETI, 2007). Sanitizantes alternativos são testados na procura da substituição dos compostos clorados. A pesquisa tem se focado nos tensoativos pela sua capacidade bactericida e, ou como coadjuvantes (detergência) na ação de outros sanitizantes com o intuito de melhorar a eficiência dos processos de sanitização.

As indústrias que comercializam produtos de higienização e a própria (ANVISA) têm procurado alternativas para aumentar a segurança microbiológica de vegetais folhosos consumidos crus.

Entre as opções, encontram-se o aumento da eficiência dos sanitizantes e a introdução de uma etapa de uso de agentes detergentes. Os surfactantes têm sido a alternativa mais aplicada para uso como detergentes para folhosas, embora, nenhum deles tenha sido aprovado com esse fim pela legislação brasileira. Isso demonstra a necessidade de mais estudos para que o uso de surfactantes como detergentes possa ser aplicado no controle microbiológico em folhosas ingeridas cruas.

No entanto, a informação relativa da atividade dos tensoativos, sobre bactérias aderidas às hortaliças é limitada e inconclusiva. Isso, provavelmente, devido a fatores como: variação das superfícies vegetais, estádios de maturidade, abundância de ceras superficiais, entre as características de superfície relevantes, e características particulares de cada bactéria como: hidrofobicidade superficial, presença de fimbria, capacidade de produção de exopolímeros, etc.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo estudar a eficiência de surfactantes catiônicos e aniônicos na inativação e remoção de *Salmonella* Enteritidis aderida à superfície de alface de folha lisa e crespa. Além disso, a relação da hidrofobicidade e energia livre global do sistema com a capacidade de adesão da *Salmonella* Enteritidis e a sua resistência à remoção pelos surfactantes será investigada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* Enteritidis

Salmonella Enteritidis que pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, geralmente móveis por flagelos peritríquios, com crescimento ótimo a 37 °C. São termo-sensíveis e destruídos facilmente por temperaturas de pasteurização (ADAMS e MOSS, 2000).

Embora *Salmonella* Enteritidis possa crescer em pH 5,2 e temperatura de 46,2 °C, o pH ótimo de crescimento é próximo da neutralidade, sendo considerados inativos em pH com valores acima de 9,0 e abaixo de 4,0 (JAY, 2005).

Nas condições ótimas de disponibilidade de nutrientes, atividade de água, temperatura e pH, a bactéria pode multiplicar-se a cada 20 minutos (ABUSHELAIBI et al., 2003).

Assim, como outras células bacterianas, a *Salmonella* Enteritidis, sob condições favoráveis, pode iniciar um processo de adesão e colonização na superfície das frutas e hortaliças. No caso da alface, essa bactéria, quando aderida, sobrevive ao longo do cultivo, desde a fase de mudas, até a pós-colheita (ISLAM et al., 2004; ERCOLANI, 2005).

As células bacterianas de *Salmonella* Enteritidis produzem polímeros extracelulares que dão lugar à formação de biofilme. Este processo favorece a tolerância à dessecação e à ação letal da luz ultravioleta. No caso das alfaces tipo repolhuda, as folhas envoltentes protegem as células bacterianas da incidência da radiação solar, favorecendo a sobrevivência da bactéria.

2.2 Análise de espécies de *Salmonella*

Métodos aceitos internacionalmente para a análise de salmonelas são descritos pelo *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), editado pela *Food and Drug Administration* (FDA) ou pelo *Standard Methods for Examination of food Microbiology*, editado pela *American Public Health Association* (APHA).

O método proposto pela APHA é o adotado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este método permite a detecção deste microrganismo, mesmo em alimentos que apresentem situações extremamente desfavoráveis para o seu desenvolvimento, como em alimentos com microbiota competidora maior que a população de *Salmonella* sp., alimentos com células bacterianas muito reduzidas e, ou alimentos em que as células se encontram injuriadas pelo calor, congelamento, secagem, salga, cura, entre outros durante a conservação ou transporte.

A determinação de *Salmonella* pelo método da APHA (2001) envolve as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação completa das colônias por meio de testes bioquímicos e sorológicos. No pré-enriquecimento, geralmente usa-se caldo lactosado, no qual as bactérias utilizam a lactose e reduzem o pH, que gera efeito bacteriostático na microbiota competidora, favorecendo o isolamento da *Salmonella* sp. (FLOWERS, 2001; SILVA, 2003).

Os meios seletivos utilizados são Agar Bismuto Sulfito (BS), Agar Verde Brilhante (BG), ágar Mac-Conkey, ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar Hektoen Entérico (HE), ágar Xilose Lisina Desoxicolato Citrato (XLD). Esses meios estão destinados a promover o crescimento unicamente de colônias de *Salmonella* com características típicas que permitam a sua identificação, para posterior confirmação bioquímica e sorológica (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997).

Na identificação bioquímica, os meios mais utilizados são o agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e o agar Lisina Ferro (LIA). O meio TSI monitora a produção de sulfeto de hidrogênio e utilização de glicose, lactose e sacarose, enquanto que o LIA monitora a produção de sulfeto de hidrogênio e a descarboxilação de lisina. Esses dois meios são utilizados em combinação e fornecem uma análise bioquímica preliminar de culturas suspeitas.

A identificação presuntiva de *Salmonella* inclui o meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM), que avalia a produção de H₂S, indol e motilidade, e o caldo ureia que avalia a utilização desta pelo microrganismo. A confirmação final é realizada com testes sorológicos, porque as diferentes estirpes de *Salmonella* nem sempre produzem reações bioquímicas típicas (FLOWERS, 2001).

2.3 Superfície foliar e Adesão bacteriana

Durante a colonização bacteriana na superfície das plantas, as características físico-químicas da superfície celular e a produção de substâncias exopoliméricas são fundamentais, resultando na formação de biofilme (CHARACKLIS, 1990). As propriedades e estrutura dos biofilmes sobre a superfície foliar dão aos sítios com biofilme, características de micro nichos (MORRIS e MONIER, 2003).

Essas propriedades derivam da natureza físico-química do biofilme e da organização espacial das bactérias dentro dele. A natureza semelhante a um gel da matriz polimérica define, em parte, a difusão e o movimento convectivo ao longo do biofilme, atuando como peneira molecular e absorvente de nutrientes (MORRIS e MONIER, 2003).

Por outro lado a rugosidade, composição, pH, temperatura, força iônica, e a presença de partículas inorgânicas na superfície foliar afetam a adesão dos microrganismos (CHAVES, 2004; GARRET et al., 2008). Em consequência, a distribuição espacial da bactéria aderida na superfície da folha não ocorre em um modelo uniforme ao longo da mesma, o que reflete a heterogeneidade espacial.

Tanto na alface, quanto em outros vegetais folhosos, a base glandular dos tricomas é o sítio com maior probabilidade de presença de bactérias na superfície foliar (BREWER et al., 1991). Além disso, há secreção de mucilagem, com compostos químicos diversos, que incluem açúcares simples e proteínas, substâncias imprescindíveis para o crescimento das bactérias (BRANDL e AMUNDSON, 2008).

A adesão das bactérias e a formação de biofilme sobre as hortaliças folhosas favorecem a sobrevivência e resistência das bactérias aos processos de desinfecção. Esta preocupação é válida considerando-se a possibilidade de que patógenos como *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* apresentem, através destes mecanismos,

resistência aos tratamentos comuns de desinfecção (BRANDL e AMUNDSON, 2008; CHANG et al., 2007).

Nesse sentido, a utilização de substâncias como os surfactantes são válidos porque favorecem a remoção de bactérias por meio da mudança das características eletrostáticas das superfícies, afetando positiva ou negativamente o processo de adesão bacteriana.

2.4 Fatores físico-químicos e termodinâmicos que influenciam a adesão bacteriana

As propriedades da maioria das bactérias são semelhantes aquelas dos colóides por apresentarem, em geral, carga global negativa, densidade pouco superior à da água, comprimento de aproximadamente 2 μ m, e serem cobertas com biomacromoléculas. Conseqüentemente, a adesão a superfícies tem sido interpretada de acordo com a teoria de DLVO, que explica a estabilidade de colóides liofóbicos (MARSHALL et al., 1992; UBBINK e ZAMMARETTI, 2007).

2.4.1 Teoria de DLVO (Dejaguin e Landau (1941), Verwey e Overbeek (1948))

A teoria de DLVO explica o processo de adesão dos microrganismos com base na interação entre partículas coloidais e despreza todos os aspectos microbiológicos da adesão.

Segundo essa teoria, a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre forças atrativas de van der Waals e as forças da dupla camada elétrica. Uma vez que a maioria das superfícies adquire carga negativa, quando em solução aquosa; as forças da dupla camada elétrica apresentam geralmente um caráter repulsivo.

Os três tipos de forças genericamente designados por forças de van der Waals são: (1) Dispersão de London, ocorre quando dois átomos se aproximam e se atraem, devido à formação de dipolos instantâneos induzidos (alteração relativa da posição do elétron em relação ao nêutron); (2) interações de Debye, se manifestam quando uma molécula que possui um dipolo interage como um átomo, criando-se uma situação dipolo-dipolo induzido; (3) interações de Keesom que se manifestam quando duas moléculas se aproximam criando interações dipolo-dipolo.

A intensidade das forças de van der Waals é diretamente proporcional ao tamanho dos corpos que interagem e varia na razão inversa da distância à superfície interagente.

Os microorganismos em soluções aquosas com pH neutro apresentam cargas negativas em sua superfície, no entanto esta carga é influenciada pelas variações do pH.

A superfície de um sólido eletricamente carregada em contato com uma solução aquosa atrai íons de sinal contrário ao meio e simultaneamente repele os íons de sinais iguais.

Esta teoria considera apenas as forças de longo alcance, no entanto, quando uma partícula ou célula microbiana encontra-se muito próxima de uma superfície (entre 2 e 5 nm), forças de curto alcance passam a regular o processo.

As forças de curto alcance são denominadas de não DLVO e estão representadas pelas forças de repulsão de Born, de hidratação, interações hidrofóbicas e pontes poliméricas, que permitem justificar os desvios da teoria DLVO. Essas forças não são facilmente quantificáveis, com exceção da interação hidrofóbica (ELIMELECH et al., 1995) que é considerada a força de curto alcance mais importante para a adesão bacteriana (BUSSCHER et al., 1984).

Na teoria de XDLVO, que é uma forma estendida da teoria de DLVO, foram adicionados aspectos termodinâmicos da adesão tais como o cálculo das interações de Lifshitz-van der Waals, ácido-base de Lewis, forças da dupla camada elétrica e movimentos Brownianos. Nessa teoria consideram-se principalmente as forças das interações hidrofóbicas que são comumente utilizadas para o cálculo da energia livre global do sistema.

Quando duas partículas ou macromoléculas imersas numa solução aquosa se aproximam, as primeiras forças de interação que se estabelecem entre as duas superfícies são: Interações de Lifshitz-van der Waals (LW); Interação ácido-base de Lewis (AB); forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (DL); interações dos movimentos Brownianos (BR).

A energia livre total destas interações é resultante do somatório das energias livres de cada uma das forças de interação, expressas segundo a equação (1)

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{LD} + \Delta G^{BR} \quad \text{Equação (1)}$$

em que, as energias livres de cada componente são expressas como variação de energia livre de Gibbs (ΔG).

2.5 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade é um parâmetro fundamental na interpretação do fenômeno da adesão de microrganismos às superfícies em ambientes com presença de água. Em termos de energia livre, a hidrofobicidade mede a interação entre as moléculas da superfície-água-superfície em médio aquoso (ΔG_{SAS}^{TOT}), assim se ΔG_{SAS}^{TOT} assume valores positivos, a interação é hidrofílica e pelo contrario hidrofóbica se ΔG_{SAS}^{TOT} é negativa, este último significa que as moléculas do sólido têm mais atração entre si, que pela água.

Uma superfície que não possui grupos polares ou iônicos ou locais de ligação de hidrogênio na sua superfície não tem afinidades pela água, e é considerada hidrofóbica.

No processo de adesão entre duas superfícies, em meio aquoso, é preciso que o filme de água que as separa seja removido, e a hidrofobicidade contribui para essa remoção, favorecendo a adesão.

Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade em função dos meios de crescimento e a capacidade de produção de exopolímeros (OLIVEIRA, 2006). Isso pode alterar o grau de interação superfície - bactéria, consequentemente a adesão.

No caso das bactérias Gram-negativas como *Salmonella* spp., a hidrofobicidade é aumentada quando a disponibilidade de água no meio é reduzida, porque a membrana externa possui grande concentração de lipídios e pouco peptidoglicanos, o que confere uma maior resistência à umidade (STREVETT, 2003).

A hidrofobicidade, tanto em bactérias, quanto em superfícies, pode ser determinada por diversos métodos, como ser a adesão microbiana a hidrocarbonetos, a cromatografia de interação hidrofóbica, e a medida do ângulo de contato (OLIVEIRA et al., 2007), método quantitativo mais frequentemente utilizado.

2.5.1 Método do Ângulo de Contacto

O método do ângulo de contato é uma medida da hidrofobicidade ou molhabilidade de uma superfície. Esta técnica requer que as superfícies a serem medidas sejam planas, lisas e homogêneas.

Para a medição do ângulo de contato gotas de três líquidos diferentes, com tensão superficial conhecida (Tabela 1), são depositadas de uma em uma por vez, sobre a superfície da amostra a ser caracterizada. A largura da base e a altura da gota são medidas a partir de imagens digitalizadas, sendo logo relacionadas entre si pela tangente do ângulo formado ($\tan(\theta/2) = 2h/w$) em que, θ é o ângulo de contato, h é altura da gota, e w é a largura da base da gota (Figura 1).

Os valores do ângulo de contacto obtidos com água sobre a superfície são classificados como hidrofóbicos quando o ângulo é maior que 65° e hidrofílico se o ângulo é menor que 65° (VOGLER, 1998; VALCARCE et al., 2002).

Esta forma quantitativa para a caracterização da natureza hidrofóbica/hidrofílica das superfícies permite o cálculo das energias livres de superfície, se medidos além, os ângulos de contato de outros dois líquidos de polaridade diferente é conhecida. Usualmente são utilizados líquidos como formamida, bromonaftaleno, glicerol, decano e di-iodometano (VAN DER MEI et al., 1998).

Para lograr medições apropriadas por esse método, a tensão superficial do líquido a ser utilizado, deve ser superior à tensão superficial da superfície estudada. Para isso, os líquidos devem ser previamente testados visualmente, deixando cair uma gota sobre a superfície. Se a gota se achatar ou absorver rapidamente à superfície, o líquido em questão não é apropriado. A conservação do formato esférico da gota do líquido sobre a superfície é ideal por permitir a obtenção de medidas do ângulo de contato (figura 1). Na Tabela 1 são apresentadas as tensões superficiais de três líquidos, comumente utilizados na medida dos ângulos.



Figura 1 Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. As tensões superficiais da superfície do sólido γ_s , do líquido γ_L e superfície/líquido γ_{SL} . Imagem extraída de Van Loosdrecht et al., (1987).

Tabela 1: Componentes da tensão de superficial de líquidos a 25 °C.

Líquido	Tensão superficial (mJ·m ⁻²)			
	γ^{tot}	γ^{LW}	γ_L^+	γ_L^-
Bromo naftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58,0	39,0	2,23	39,6

Fonte: VAN DER MEI et al. (1998)

Os valores dos ângulos obtidos, para os líquidos utilizados no método do ângulo de contato, são relacionados com as tensões interfaciais do sólido e líquido mediante a equação de van Oss-Chaudhury-Good (1998) (Equação 1) da teoria XDLVO, para a determinação da hidrofobicidade em termos de energia livre total.

Para isso, os componentes apolar (γ_L^{LW}) e polar (γ_L^+ , γ_L^-) da tensão interfacial do líquido (valores de tabela), são utilizados para a conformação de um sistema de três equações, cuja resolução permitira o cálculo da tensão interfacial do sólido (γ_s), nos seus componentes apolar (γ_s^{LW}) e polar (γ_s^+ , γ_s^-), (Equação 2).

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

Os valores de tensão interfacial do sólido encontrados são relacionados com a energia livre de interação ΔG_{SAS}^{TOT} , entre as moléculas da superfície sólida (S) imersa em água (A) e calculada pelo somatório das componentes apolar (ΔG_{SAS}^{LW} , interações de Lifshitz-van Der Waals) e polar (ΔG_{SAS}^{AB} , interações ácido-base de Lewis), mediante a equação (3).

$$\Delta G_{SAS}^{TOT} = \Delta G_{SAS}^{LW} + \Delta G_{SAS}^{AB} \quad (\text{Equação 3})$$

Em geral, a interação de energia entre duas superfícies sólidas (S), imersas em um líquido (L), pode ser expressa em termos de tensão interfacial. Em que a componente apolar é determinada por:

$$\Delta G_{SAS}^{LW} = -2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} - \gamma_A^{LW}} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

e a componente polar por:

$$\Delta G_{SAS}^{AB} = -4 \left(\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} + \sqrt{\gamma_A^+ \gamma_A^-} - \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_A^-} - \sqrt{\gamma_A^+ \gamma_S^-} \right) \quad (\text{Equação 5})$$

O processo de adesão de uma célula microbiana a uma superfície sólida imersa em solução aquosa, somente se estabelece se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, a interface bactéria/líquido (BL) e a interface superfície de adesão/líquido (SL) terá que ser substituída pela interface bactéria /superfície de adesão (BS).

Termodinamicamente, a energia livre permutada neste fenômeno tende a ser minimizada, e a adesão só ocorre se o sistema conduzir a uma diminuição da

energia livre global. A energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) entre duas superfícies é dada pela equação de Dupré (van Oss, 1991), (Equação 6).

$$\Delta G_{adesão} = \gamma_{BS} - \gamma_{BL} - \gamma_{SL} \quad (\text{Equação 6})$$

em que γ_{BS} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão, γ_{BL} é a tensão interfacial entre bactéria/líquido, e γ_{SL} é a tensão interfacial entre a superfície de adesão/líquido.

A tensão interfacial total corresponde ao somatório da componente apolar e polar, expressa na equação 7.

$$\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (\text{Equação 7})$$

Esta equação expressa a aditividade dos componentes polar e apolar em termos de tensão interfacial. Por analogia a equação de Dupre (Equação 6), pode ser reformulada de forma a obter a energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) expressa na Equação 8.

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{BLS}^{LW} + \Delta G_{BLS}^{AB} \quad (\text{Equação 8})$$

Termodinamicamente para que a adesão seja favorecida é necessária a diminuição da energia livre global ($\Delta G_{adesão} < 0$), no entanto, nem sempre este critério é verificado, sendo que a adesão ocorre mesmo quando $\Delta G_{adesão} > 0$. Isto pode ser explicado pelo fato de que nenhuma destas teorias leva em conta os aspectos microbiológicos que alteram a interação superfície/superfície em médio aquoso.

2.5.2 Hidrofobicidade da alface

Todas as partes dos vegetais expostas à atmosfera são cobertas com material lipídico, que reduzem a perda de água e auxiliam a bloquear a entrada de fungos ou bactérias patogênicas. Os principais tipos de revestimento são a cutina, a

suberina e as ceras. Cutina, ceras e suberina são produzidas a partir de compostos hidrofóbicos.

A cutícula é formada por uma cobertura de cera, uma camada intermediária espessa, contendo cutina embebida em cera e uma camada interna formada de cutina e cera, combinadas com substâncias da parede celular, tais como pectina, celulose e outros carboidratos (a camada cuticular).

A cutina é o principal constituinte da cutícula, uma estrutura secretada, pluriestratificada, que cobre as paredes celulares externas da epiderme e das partes aéreas de todas as plantas herbáceas. Esta macromolécula é um polímero formado por muitos ácidos graxos de cadeias longas, ligados uns aos outros por ligações ésteres, constituindo uma rede tridimensional rígida.

As ceras não são macromoléculas, mas uma mistura complexa de acil lipídeos de cadeia longa, as quais são extremamente hidrofóbicos. Os componentes mais comuns das ceras são os alcanos de cadeia linear e os alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres de cadeias longas e ácidos graxos livres. As ceras da cutícula são sintetizadas pelas células epidérmicas e daí liberada em gotas, que atravessam os poros da parede celular por um mecanismo ainda desconhecido.

Nas folhas de alface este mecanismo forma uma camada, composta de cutícula e ceras do epicuticular que determinam as características da superfície, no que se refere à hidrofobicidade (ENSIKAT, 2006).

Frequentemente, a cobertura superior da cera cuticular cristaliza-se em um complexo-padrão de bastonetes, tubos ou lâminas. Certos padrões dessas microestruturas acentuam a repelência à água pelo aumento da aspereza da superfície da cera. Dessa maneira, gotas de água formam-se instantaneamente ao contato com a cera e carregam partículas contaminantes, limpando a superfície da planta.

Todavia, cutina, ceras e suberina associadas formam barreiras entre as plantas e seus ambientes, e agem evitando a dessecação e entrada de patógenos (TAIZ e ZEIGER, 2004), em razão de que as redes de hidrocarbonetos de cadeia longa constituintes dessas estruturas cuticulares outorgam uma forte característica hidrofóbica (BUCHANAN et al., 2000).

2.6 Efeito dos surfactantes sobre a remoção de células bacterianas

Entre as várias estratégias de controle da contaminação microbiana se encontra o uso de surfactantes. Também chamados de tensoativos, são compostos anfifílicos, orgânicos ou organometálicos que formam colóides ou micela em solução. Os surfactantes em soluções aquosas diluídas (menores que 10^{-4} mol·dm⁻³) apresentam comportamento similar a eletrólitos fortes.

Na elevada concentração ocorre desvio do comportamento ideal, buscando o decréscimo de energia livre do sistema, resultando na associação preferencial das cadeias hidrofóbicas, que é chamada de formação de micelas. A concentração mínima para formar micela denomina-se concentração micelar crítica (CMC), e a temperatura mínima é chamada de ponto de Kraft, abaixo das quais, se tem monômeros livres em solução (AZEREDO, 1998; AZEREDO e OLIVEIRA, 2002).

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

Dependendo da estrutura química dos grupos polares, os surfactantes podem ser não-iônicos, aniônicos, catiônicos e anfóteros. O tensoativo não iônico não libera carga em solução aquosa, os demais liberam um ânion e um cátion, respectivamente.

Os surfactantes aniônicos reduzem a permeabilidade da parede celular e podem solubilizar a membrana celular. Os surfactantes catiônicos se adsorvem à superfície da membrana celular e reagem com os fosfolipídios que compõem a membrana citoplasmática, e também, reagem quimicamente com a carga negativa dos íons associados à parede celular (LUTEY, 1995). Consequentemente, as forças eletrostáticas estabelecidas entre a substância química e a célula geram estresses, levando à perda de constituintes citoplasmáticos e posteriormente à morte da célula.

Entre os surfactantes catiônicos, os compostos quaternários de amônio (QAT's), que são uma mistura de compostos de cloreto de alquil dimetil benzil amônio, possuem atividade antimicrobiana por causar desnaturação das proteínas, alterando a permeabilidade seletiva da parede celular e reduzindo a entrada normal de nutrientes na célula. Consequentemente há saída de potássio (K^+) e de outros constituintes intracelulares, induzindo a autólise celular morte da célula (ISHAKAWA, 2002; McDONNELL e RUSSELL, 1999; TABATA et al., 2003).

A atividade antimicrobiana do QAT's depende da sua estrutura e peso molecular, mas, especialmente, do comprimento da cadeia longa do grupo alquil. A eficácia dos QAT's aumenta com a temperatura e o pH, sendo as condições alcalinas as mais favoráveis. Em pH menor que três, os QAT's são praticamente ineficientes. Devido à grande capacidade de desinfecção, a concentração de uso é, normalmente, menor que 1% (Gardner et al., 2000), sendo, especialmente, eficaz entre pH 6 e 8.

2.6.1 Cloreto de Benzalcônio (BAC)

O nome químico do cloreto de benzalcônio é alquil dimetil benzil cloreto de amônio, com peso molecular de 354 é um líquido viscoso incolor, solúvel em água, com pH entre 7 e 8 e temperatura de 20 °C. Cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 2.

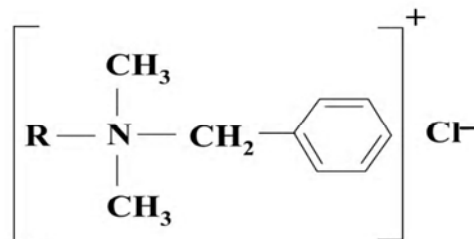


Figura 2. Estrutura química do Cloreto de Benzalcônio (BAC)

O Cloreto de Benzalcônio (BAC) é um agente antimicrobiano sintético usado como desinfetante nos processos de linha e superfícies em indústrias de alimentos e como preservante antimicrobiano em fármacos (MANGALAPPLI e KORBER, 2006).

O espectro de atividade antimicrobiana do BAC é amplo incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos, líquens e microrganismos formadores de biofilme. Como composto ativo nas superfícies, o BAC, quando usado em concentrações de 10% a 20%, reduz a tensão superficial da água, causa uma boa umidificação e penetração em fissuras, ranhuras e fendas naturais, como no caso de superfícies foliares, mostrando, portanto, condições de ser utilizados como agente de pré-tratamento de superfícies. A baixa concentração o BAC é bacteriostático e bactericida a elevadas concentrações (HOUARI e DI MARTINO, 2007).

2.6.2 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

O SDS é um surfactante aniônico, portanto sua zona polar está carregada negativamente. O contra-íon (normalmente sódio, potássio ou íons de amônio) exerce escassa influência sob as propriedades superficiais destas substâncias. O grupo polar negativo é geralmente sulfato ou sulfonato. Surfactantes aniônicos, como o Dodecil sulfato de sódio (SDS) de peso molecular 288,38 g/mol, cuja estrutura molecular se apresenta na (Figura 3).

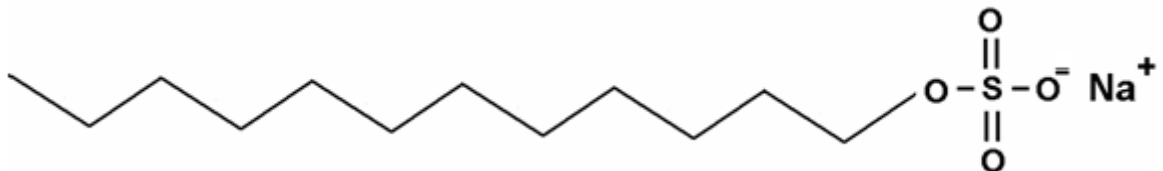


Figura 3.. Estrutura Molecular do Dodecil sulfato de Sódio

O SDS exibe algum efeito antimicrobiano só em pH 2 a 3, em estado no dissociado, a sua principal característica e detergente. Estudos toxicológicos do SDS para o ser humano têm relatado como dose letal via oral, 0,5 - 5,0 g / kg. Por via cutânea 25 mg / 24 horas tem provocado irritação suave e, para ratos a dose letal media (LD50) por via oral encontra-se em 1,29 g/kg (TAHA et al., 2008).

A adsorção dos surfactantes aniônicos sobre superfícies sólidas pode modificar as características da superfície e a transferência de elétrons. Além disso, pode induzir à formação de agregados na superfície similares a micelas e

incrementar a espessura do filme de outras moléculas adsorvidas (ESUMI et al., 2000; CHURAEV, 2000).

Os surfactantes aniônicos não só mudam as características superficiais dos sólidos pela adsorção, como também favorecem a solubilidade de compostos altamente solúveis em água (HARRISON et al., 1999).

2.7 Compostos clorados

A sua fórmula molecular $C_3Cl_2N_3NaO_3$, com solubilidade de 25 g de NaDCC / 100 g de água a 25 °C, a fórmula estrutural é apresentada na figura (4). A atividade bactericida não é afetada na faixa de pH 6 a 10.

O cloro, nas suas varias formas, é o sanitizante mais utilizado na indústria de alimentos por ser de baixo custo e efetivo na eliminação de bactérias Gram positivas e negativas, leveduras e fungos filamentosos. O dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) é amplamente utilizado para desinfecção de frutas e hortaliças.

A ação antimicrobiana dos compostos de cloro em solução aquosa, com exceção do dióxido de cloro, está relacionada à liberação de ácido hipocloroso. Essa forma não dissociada tem cerca de 80 vezes capacidade bactericida que a forma dissociada (ANDRADE, 2007).

Esta forma não dissociada reage com as proteínas da membrana celular microbianas, formando compostos N-cloro, interferindo no transporte de nutrientes e promovendo a perda de componentes celulares. Na forma não dissociada, penetra através da membrana celular e oxida os grupos sulfídricos de certas enzimas importantes da via glicolítica inibiendolas (ANDRADE, 2007).

A sua fórmula molecular $C_3Cl_2N_3NaO_3$, com solubilidade de 25 g de NaDCC / 100 g de água a 25° C, sua atividade bactericida não e afetada na faixa de pH 6 a 10.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.1 Amostras de alfaces

Amostras de alface (*Lactuca sativa* L.) das cultivares Vitória de Santo Antão e Verônica Crespa, cultivadas convencionalmente, sob ambiente protegido e irrigação por aspersão, foram coletadas em uma propriedade rural produtiva nos arredores de Viçosa, MG.

Vitória de Santo Antão é uma alface de roseta compacta com folhas onduladas e lâmina lisa com nervura principal dominante (Figura 1a). A cultivar Verônica Crespa (Figura 1b) possui roseta aberta, tem folhas compridas, encrespadas e lâmina foliar rugosa devido à extensa rede vascular primária e secundária.

3.2 Microrganismo

A bactéria *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Microbiologia da UFV.

3.3 Microbiota das alfaces

A microbiota foi determinada em rosetas de alface colhidas nas primeiras horas da manhã, de maneira aleatória e abrangendo cada área de produção. As rosetas foram manipuladas assepticamente desde o corte até o laboratório. As rosetas foram

cortadas com faca esterilizada acima das folhas em contato com o solo, embaladas em sacos estéreis e imediatamente transportadas e mantidas refrigeradas até o laboratório, onde foram armazenadas a 10 ± 1 °C por 4 h, até a sua utilização.

A microbiota natural foi quantificada a partir da preparação de homogenatos no stomacher Marconi, usando-se 25 g da amostra para 225 mL de água peptonada a 0,1 %. A partir do homogenato, alíquotas de diluições foram inoculadas em superfície ou profundidade nos correspondentes meios adequados ao grupo microbiano alvo.



Figura 4. Alface (A) cv. Vitória de Santo Antão, (B), cv. Crespa Verônica

Para a contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos, bactérias lácticas, coliformes totais, fungos filamentosos e leveduras utilizaram-se as metodologias da *American Public Health Association* (APHA) descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods* (Vanderzant e Splittstoesser, 2001) e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama amostra de alface (UFC / g).

Para a avaliação de aeróbios mesófilos o inóculo foi plaqueado em profundidade, e coberto por o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem (PCA), incubado a 35 ± 1 °C / 48 ± 2 h.

No caso das bactérias lácticas estas foram avaliadas por plaqueamento em profundidade e coberto com meio de cultura Agar de Manga Rogosa e Sharpe (MRS) com sobre-camada, cobrindo totalmente a superfície do meio inoculado, para

garantir condições microaerófilas. Incubar a 32 °C /48 horas. Contagem de bactérias típicas.

Coliformes Totais e *Escherichia coli* o inóculo da amostra foi plaqueado em profundidade em meio de cultura Ágar Vermelho Violeta Bile com Lactose (VRB) e, após de completa solidificação do meio, cobrir com uma sobre camada de 5 a 8 mL do mesmo meio. Incubada a 35 ± 1 °C / 24 ± 2h, se contaram as colônias típicas de coliformes totais (vermelho púrpura), com 0,5 mm o mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares. E os resultados expressos em UFC/mL.

Os Bolores e leveduras foram plaqueadas em superfície do meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA),o meio foi acidificado com ácido tartárico aos 2 % e incubada a 25 ± 1°C / 72 h, se contaram fungos características, os resultados foram expressos em UFC / mL.

Salmonella Enteritidis foi avaliada com plaqueamento superficial em meio Agar Hektoen entérico, incubada a 37 ± 1 °C / 24 h, foram contadas colônias típicas isto é aquelas com centro preto e halo verde claro, e os resultados expressos em UFC / mL.

3.4 Determinação da hidrofobicidade

As propriedades termodinâmicas da superfície do microrganismo e da superfície foliar de alface foram avaliadas mediante o método do ângulo de contato utilizando a equação de van Oss-Chaundhury –Good (1998), descrita a seguir:

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

e, expressa em (mJ/m²).

O ângulo de contato (θ) foi medido pelo método da gota séssil estática (Figura 1) em goniômetro Kruss, utilizando três líquidos de diferente polaridade (Tabela 1). Neste método 2 µL de cada líquido foram depositados sobre a superfície da amostra a ser medida (alface, bactéria). Cada amostra foi adequadamente preparada para as medições.

Os ângulos de contato na superfície foliar foram medidos em cupons de alface de 2 x 2 cm aderidas em lâminas de vidro para manter a superfície plana e permitir a medição em várias regiões de cada cupom. Em cada superfície foram realizadas 25 medições por ponto aleatório, e três pontos aleatórios por repetição, sendo três repetições por cada superfície.

Os valores dos ângulos de contacto obtidos para água, formamida e B-naftaleno, foram substituídos na equação de van Oss-Chaundhury-Good e obtidas três equações, a partir das quais foram calculados os valores da tensão interfacial do sólido, em superfície bacteriana e superfície foliar da alface. Essas tensões interfaciais do sólido foram relacionadas com a energia livre total do sistema mediante as equações 3 a 7, descritas anteriormente. Finalmente, a hidrofobicidade bacteriana e foliar foi calculada em termos de energia livre. As superfícies com ΔG negativos foram consideradas hidrofóbicas, segundo a teoria de XDLVO.

3.4.1 Hidrofobicidade de folhas de alfaces

A hidrofobicidade foi determinada pelo método da gota pendente em uma superfície foliar (cupom) de 2 cm x 2 cm aderidas a lâmina de vidro para manter a amostra plana e permitir as medições em várias regiões do cupon. Foram feitas 25 medições dos ângulos de contato para cada cupom.

Ao longo da roseta foi determinada a hidrofobicidade de folhas em três posições: externa, intermediária e interna. Sendo a externa a mais madura e a interna a primeira folha com comprimento menor que 10 cm próximos ao coração da roseta. Entre esses limites foi obtida a folha intermediária.

3.4.2 Hidrofobicidade da *Salmonella Enteritidis*

As medidas do ângulo de contato foram realizadas sobre uma camada de células vegetativas, segundo metodologia proposta por BUSCHER et al., (1984).

Para a obtenção da camada de células vegetativas, o microrganismo foi cultivado em duas repicagens consecutivas em *Trypticase Soy Broth* (TSB) a 37 °C / 24 h, em sistema estático.

As células separadas por centrifugação a 3000 g x min foram lavadas por três vezes, com solução fosfato PBS 0,1 M. O concentrado de massa celular foi re-

suspendido em solução tampão fosfato (PSB) com pH 7 e composição (0,75 g·L⁻¹ de KH₂PO₄; 3,12 g·L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,25 g·L⁻¹ de NaCl), obtendo-se uma suspensão de, aproximadamente, 10⁸ UFC / mL.

Trinta mililitros da suspensão de células adicionados, a 30 mL de água esterilizada foram filtrados em membrana de acetato de celulose de porosidade 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, com bomba de vácuo. O filtro contendo as células foi conservado em placa Petri, contendo 1% de ágar para contagem total (PCA) e 10 % de glicerol, até a medição dos ângulos.

Os ângulos de contato na superfície das bactérias foram medidos em camada fina de bactérias previamente cultivadas em médio Tryptic Soy Brother (TSB) e filtradas. Os ângulos de contato na superfície foliar foram medidos em cupons de alface de 2 x 2 cm aderidas em lâminas de vidro para manter a superfície plana e permitir a medição em várias regiões de cada cupom. Em cada superfície foram realizadas três repetições, sendo 25 medições por ponto aleatório, e três pontos aleatórios por repetição.

3.5. Adesão de *Salmonella* Enteritidis em folhas de diferentes posições da roseta de alface

Cinco cupons de folhas de alface de 2 cm x 2 cm, somando uma área total de 40,0 cm², foram imersas em uma suspensão de 10⁵ UFC / mL a 25 °C por 12 h. Após este tempo, as peças de alface foram transferidas com uma pinça esterilizada a um tubo de centrífuga contendo 30 mL de água destilada, para serem lavadas e as células planctônicas removidas.

Os cupons lavados foram transferidos a tubos com 10 mL água peptonada 0,1% e agitados em vórtex por 2 min para retirar as células sésseis utilizando uma modificação da metodologia proposta por TAKEUCHI (2002). Uma alíquota de 0,1 mL de solução foi espalhada na superfície de placas contendo agar Hektoen.

As placas foram incubadas a 24 h / 37 °C e as colônias típicas de *Salmonella* Enteritidis contadas (colônias com centro preto e halo verde claro), e os resultados foram expressos em UFC / cm²

3.6 Temperatura e tempo na adesão de *Salmonella* Enteritidis

Cinco cupons de folhas de alface com área total igual a 40 cm² foram imersas em suspensão de *Salmonella* Enteritidis, contendo 10⁵ UFC/mL. Após 12 horas tempo de adesão, as amostras de alface foram transferidas para tubos contendo 30 mL de água deionizada esterilizada e submetida ao lavado para remoção de células planctônicas.

As células sésseis foram retiradas em água peptonada 0,1% e agitadas em vortex por 2 min. Volumes de 0,1 mL da solução foram inoculados em superfície de placas contendo agar Hektoen e incubadas a 37°C / 24h. As colônias típicas de *Salmonella* Enteritides foram contadas e os resultados expressos em UFC/cm².

Para determinação da contagem do microrganismo foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{UFC / cm}^2 = ((\text{VD}/\text{VA}) \times \text{M} \times \text{D})/\text{A};$$

em que V_D é o volume (mL) do diluente utilizado no procedimento de lavado; V_A é o volume (mL) da alíquota utilizada no plaqueamento; M é a média da contagem (UFC) obtida nas placas; D é a diluição realizada; A é a área (cm²) da superfície foliar total avaliada.

As temperaturas de adesão foram 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C para tempos de 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, e 90 min de adesão de *Salmonella* Enteritidis na superfície foliar da alface.

3.7 Eficiência bactericida do cloreto de benzalcônio e do dodecil sulfato de sódio

Cinco cupons de alface 2 cm x 2 cm cortados com bisturi esterilizado foram imersos em suspensão de 10⁵ UFC / mL de *Salmonella* Enteritidis a 25 °C por 12 h. Ao final desse tempo, os cupons foram transferidos a tubos com 30 mL de água destilada esterilizada para lavagem e remoção das células planctônicas.

Na sequência, as células sésseis foram submetidas à ação antimicrobiana do cloreto de benzalcônio, nas concentrações de (300 mg·L⁻¹, 600 mg·L⁻¹, 900 mg·L⁻¹, 1200 mg·L⁻¹, 1500 mg·L⁻¹, 1800 mg·L⁻¹ e 2000 mg·L⁻¹). Após 10 min de contato, a

atividade do surfactante foi neutralizada com solução de Tween 80% (m/v) a 2 %, durante 1 minuto.

Procedimento similar foi utilizado para avaliar a capacidade bactericida de dodecil sulfato de sódio, em concentrações de 400 mg · L⁻¹; 800 mg · L⁻¹; 1200 mg · L⁻¹; 1600 mg · L⁻¹; 1800mg · L⁻¹; 2200 mg · L⁻¹. A ação do surfactante foi neutralizada por lavagem com 30 mL de água destilada esterilizada.

Em ambos os testes para o BAC e o SDS os cupons foram transferidos com pinça esterilizada a um volume de 10 mL de água peptonada a 1% e agitação em vortex na velocidade máxima por 2 min. Diluições dessa suspensão foram plaqueadas em meio Hektoen Enteric e incubadas a 37 °C por 24h, para determinação de células sobreviventes.

A eficiência bactericida dos surfactantes cloreto de benzalcônio e dodecil sulfato de sódio foram avaliadas pelo método N° 649 teste de suspensão proposto pela Association of Official Analysts Chemists (AOAC) com modificações para células sésseis (ANDRADE, 2007). Os resultados foram expressos em número de reduções decimais (RD).

As soluções de surfactantes que obtiveram três reduções decimais foram aprovadas. Para o cálculo, foi utilizada a seguinte formula:

$$N_{RD} = \log_{10} N_A - \log_{10} N_S$$

em que, N_A é o número de células aderidas/cm² nos cupons, e N_S é o número de células sobreviventes por cm² de alface após a ação do antimicrobiano.

Nos testes de determinação da capacidade bactericida dos surfactantes BAC e SDS, além do branco, foi utilizada uma solução de dicloroisocianurato de sódio com 200 mg·L⁻¹ de cloro ativo como controle comercial das reduções obtidas pelos surfactantes. Essa concentração de cloro é a usada para a sanitização de hortaliças e frutas (MORETTI, 2007).

3.8 Planejamento experimental e análise de resultados

Na determinação da microbiota dos cultivares de alface de folha crespa e lisa foi aplicado delineamento inteiramente casualizado (DIC). Cada amostra foi avaliada com seis repetições, por duplicado. De igual maneira um DIC foi utilizado para a

adesão de *Salmonella* Enteritidis, em folhas de diferente posição na roseta de alface, com cinco repetições por amostra.

Na adesão de *Salmonella* Enteritidis em função do tempo e temperatura foi utilizado um arranjo fatorial, com três repetições. Para o fator temperatura cinco níveis 5, 10, 15, 20, 25 °C foram testadas, para cinco diferentes tempos, 5, 10, 15, 30, 60, 90 minutos.

Para determinar a função tempo-temperatura na adesão foi elaborada uma gráfica de contorno, mostrando os fatores tempo e temperatura. Os programas estatísticos utilizados foram o SAEG 9.0V e o Minitab V.0

Na determinação da hidrofobicidade, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com três repetições, cada uma com 25 medições do ângulo de contacto, para cada líquido (água, formamida, e α -bromonaftaleno), e para cada superfície (bactéria e alface). Os dados foram analisados pelo teste de F ($p < 0,01$) e pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) com o software estatístico SAEG V 9.0.

Na avaliação da ação antimicrobiana do cloreto de benzalcônio e dodecil sulfato de sódio a diferentes concentrações, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por concentração, cada uma de elas em duplicata. Os dados foram avaliados pelo teste de F ($p < 0,01$) e do Scott-Knott ($p < 0,05$). As equações foram ajustadas por regressão linear para o SDS e modelo gaussiano modificado de cinco parâmetros para o BAC, com auxílio do software estatístico SAEG V 9.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microbiota

A microbiota presente sobre a superfície foliar da alface da cv. Vitória de Santo Antão foi tipicamente não patogênica. A contagem de fungos filamentosos, leveduras e mesófilos aeróbios alcançou valores de 2,1 log UFC/ g e 3,7 log UFC / g, respectivamente, em quanto que as contagens de *Escherichia coli* e Bactérias Lácticas (BL) foram abaixo de 10^1 UFC/g (Tabela 2). Esses resultados mostraram uma boa qualidade microbiológica para a alface avaliada. As análises de *E. coli* e *Salmonella* spp., indicam que as amostras avaliadas encontram-se dentro dos padrões de qualidade microbiológica proposta pela RDC nº 12 (ANVISA, 2001).

A maior proporção de fungos e leveduras e bactérias aeróbias mesófilas sobre as patogênicas e bactérias lácticas foram também relatadas em diferentes cultivares de alfaces cultivadas em sistema convencional e hidropônica, em países como Brasil e Argentina (Lima, 2008; Velázquez et al., 2009). A ausência de *Salmonella* spp. na microbiota de alface foi também descrita por LIMA (2008) e VELAZQUEZ et al., (2009).

As bactérias lácticas têm sido relatadas como competidores e antagonicos ao crescimento das bactérias patogênicas como a *Salmonella* sp. *Aeromonas hydrophilla*, *Listeria* spp., embora haja necessidade de mais pesquisas sobre esse tópico (Lima, 2008).

Tabela 2. Microbiota em UFC / g de alface cv. Vitória de Santo Antão cultivada em ambiente protegido e sistema convencional.

Microbiota	UFC / g
Fungos e leveduras	$4,8 \times 10^3$
Bactérias aeróbias mesófilas	$1,4 \times 10^1$
Bactéria Lácticas	$1,6 \times 10^{-1}$
<i>Escherichia coli</i> a 45 °C	$2,8 \times 10^{-1}$
<i>Salmonella</i> spp. / 25g	Ausência

Média de 12 observações (UFC / g) unidades formadoras de colônias por grama de massa fresca foliar.

Sugere-se que o micro-ambiente de alface poderia ser mais favorável principalmente para aeróbios mesófilos e fungos e leveduras do que para bactérias patogênicas e que elevados valores de bactérias patogênicas em alfaces são devido à contaminação em alguma etapa da cadeia produtiva (SANTANA, 2006; OLIVEIRA, 2007).

4.2 Influência da Temperatura e tempo na adesão de *Salmonella* Enteritidis

A temperatura e o tempo de contato tiveram efeito positivo na adesão de *S. Enteritidis* sobre a superfície foliar de alface Vitória e não foi detectada interação entre esses fatores (Equação 8). Constatou-se maior efeito da temperatura sobre a adesão, como se observa pelas variáveis independentes da Equação 8 (0,025 e 0,00494).

$$\text{Log UFC/ cm}^2 = 3,29 + 0,0205 \cdot T + 0,00494 \cdot t \quad (\text{Equação 8})$$

em que (T) é temperatura em °C e (t) é tempo em minutos.

O gráfico de contorno mostra a resposta para adesão, paralelas com valores crescentes com o aumento dos níveis da temperatura e o tempo, significando que nas faixas de temperatura e tempo avaliadas, a elevação da temperatura favorece ligeiramente a maior adesão.

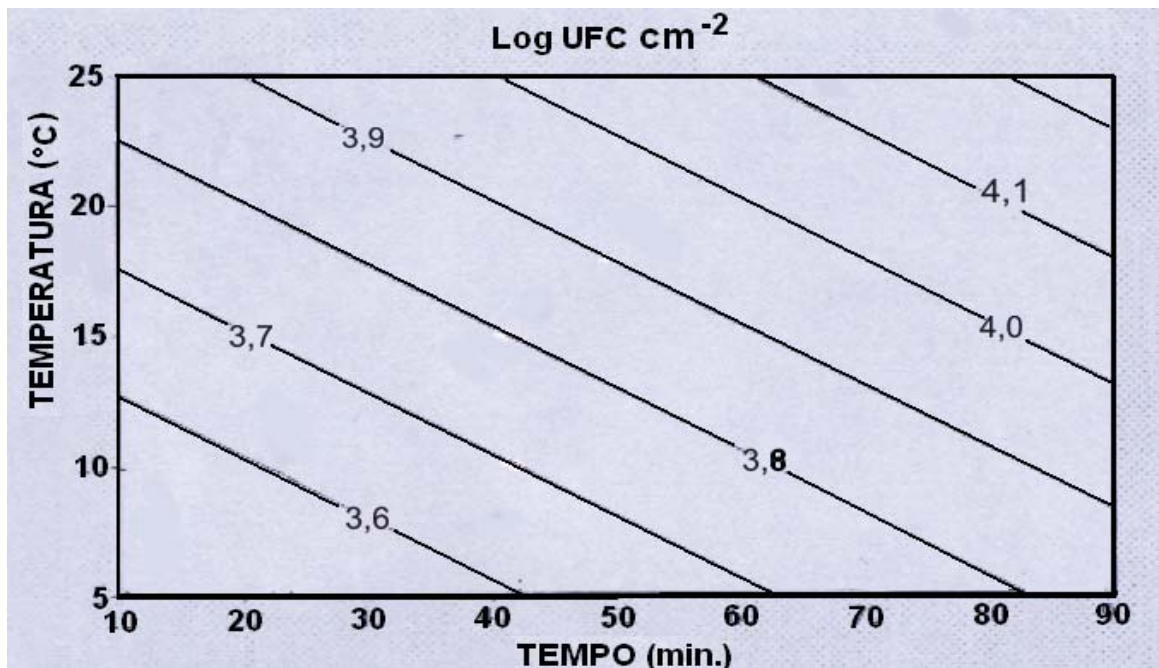


Figura 5. Efeito temperatura versus tempo na adesão de células sésseis de *Salmonella* Enteritidis (1×10^{-4} UFC / mL) na superfície foliar de alface cv. Crespa.

O aumento linear da adesão com o aumento da temperatura e o tempo de contato mostra que *Salmonella* Enteritidis pode-se desenvolver até níveis que podem causar infecções, dependendo da concentração inicial. Isso implicaria que temperaturas abaixo de 5 °C, durante o manuseio pós-colheita ou processamento mínimo de alface, devem ser utilizadas para inibir ou reduzir a adesão.

A influência maior da temperatura sobre a adesão até determinado ponto se explica pela cinética de crescimento da bactéria. Assim, para *Salmonella* Typhimurum, a elevação da temperatura até o ótimo 38 °C, favoreceu o metabolismo do microrganismo, sendo atribuída essa resposta à maior absorção e metabolização dos nutrientes, com o aumento da temperatura (SANTOS, 2004). Por outro lado, baixas temperaturas diminuiriam o tempo de geração de células.

Temperaturas ótimas para o crescimento de bactérias foram também associadas com a maior produção de exopolímeros, considerados fatores físicos da adesão em células bacterianas e com a maior formação de fímbrias quantidade, apêndices que incrementam a adesão (BOVILL, 2001; RYU, 2004).

Em *B. cereus* foi, também, observada maior influência da temperatura versus o tempo de contato na adesão sobre superfície de aço (BERNARDES, 2008). Assim, sugere-se que a adesão é favorecida com temperaturas próximas ao ótimo para cada espécie em diferentes superfícies. Isto ratifica a conveniência da utilização de baixas temperaturas como mecanismo de controle do desenvolvimento de organismos patogênicos, como *S. Enteritidis*, antes de processos de sanitização ou processamento.

4.3 Tipos de superfície foliar de alface e adesão de *Salmonella* Enteritidis

Na tabela 3, encontram-se os valores da adesão de *Salmonella* Enteritidis sobre superfície foliar de alfaces Vitória de Santo Antão e Crespa Verônica, as mesmas que apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) em função do tipo de folha de alface. Na superfície foliar da alface da cv. Vitória de Santo Antão, do tipo lisa, a adesão foi menor do que em folhas do tipo crespa do cultivar Verônica.

A diferença de adesão entre as cultivares pode ser atribuída à maior rugosidade da alface Crespa Verônica, considerando-se que as duas variedades foram cultivadas no mesmo ambiente e sistema de produção. Isso significa que a característica topográfica da superfície foliar teve influência na adesão de *Salmonella* Enteritidis.

Tabela 3. Adesão de *Salmonella* Enteritidis sobre superfícies foliares de alface após 12 h de contato a 25 °C em suspensão inicial de $1,0 \times 10^5$ (UFC / mL)

Cultivar	Superfície foliar	Log (UFC / cm ²)
Vitória de Santo Antão	Lisa	4,71 ± 0,16 a
Verônica	Crespa	5,08 ± 0,11 b

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Cada média provém de seis observações em duplicata.

A maior adesão observada em folhas crespas pode ser explicada pela multiplicidade de micro-sítios, nervuras, fendas e protuberâncias da superfície foliar, o que proporciona sítios de proteção em maior número e diversidade favorecendo a adesão na sua estrutura, em grau maior do que poderia oferecer uma folha lisa.

As imagens da figura 6 permitem observar bacilos aderidos às superfícies, observando-se que os estômatos servem de abrigo e de entrada às células do patógeno, devido a abertura estomática ser até cinco vezes o tamanho da bactéria.

Salmonella Enteritidis em cultivares com folha lisa e crespa procedentes de sistemas de produção diferentes mostraram que a rugosidade das folhas crespas cultivadas em sistema hidropônico foi quatro vezes maior do que as lisas cultivadas em sistema convencional (LIMA, 2008).

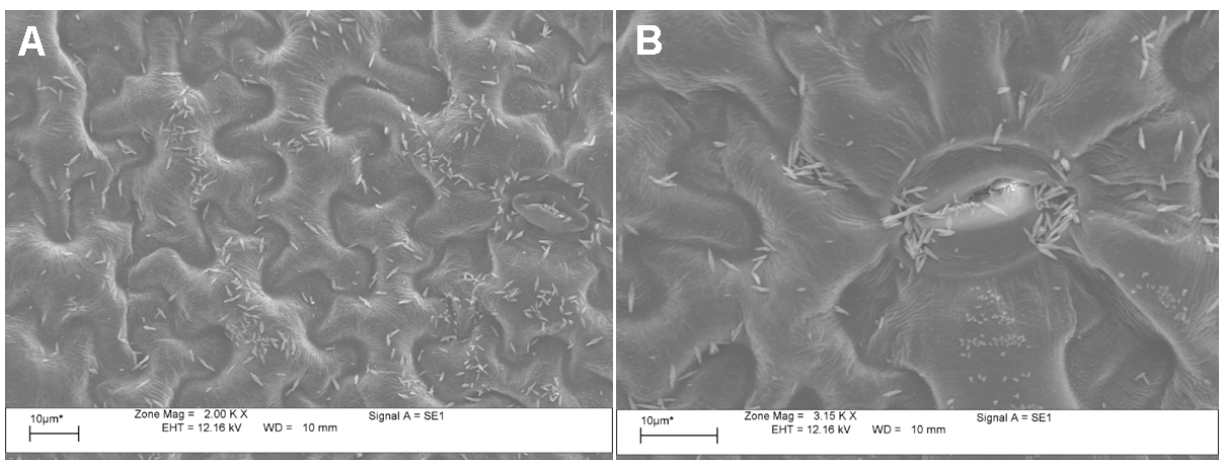


Figura 6 Microtopografia da folha de alface Vitória de Santo Antão por microscopia eletrônica de varredura. (6A) *Salmonella* Enteritidis aderidas nas crestas e vales da superfície foliar de alface. (6B) *Salmonella* Enteritidis ao redor do estômato.

Para a rugosidade influenciar na adesão do microorganismo, a diferença de altura entre o vale e a cresta tem que ser aproximadamente quatro vezes a mais do que o tamanho do microrganismo, para que este seja albergado (LIMA, 2007).

Além da microtopografia superficial, a hidrofobicidade tem sido também indicada por influir na adesão (SINDE e CARBALHO, 2000; BEUCHAT, 2002; REINA, 2002).

4.4 Hidrofobicidade de *Salmonella* Enteritidis

A tabela 4 mostra os valores dos ângulos de contato de três líquidos sobre uma camada de células de *Salmonella* Enteritidis. O valor do ângulo de contato formado com a água θ foi $29,1^\circ$, valor menor que 65° , portanto a *S. Enteritidis* pode ser

considerada hidrofílica, segundo o critério de avaliação qualitativa da hidrofobicidade (VOGLER, 1998). Assim, este valor é concordante quando comparado a valores relatados na literatura para diferentes serovares de *Salmonella* Enteritidis os mesmos que variaram na faixa de 9,7° a 35° confirmando o caráter hidrofílico da bactéria (OLIVEIRA et al., 2007).

Tabela 4 Medida dos ângulos de contato e cálculo da tensão interfacial de *Salmonella* Enteritidis

Ângulos de contato (θ°)			Tensão superficial ($\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$)			$\Delta G(\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$
$\theta^\circ_{\text{Agua}}$	$\theta^\circ_{\text{Form.}}$	$\theta^\circ_{\text{Br-naf.}}$	γ^{LW}	γ^-	γ^+	ΔG_{SAS}
29,1 ± 4,4	30 ± 8,3	82,6 ± 5,4	14,0	46,2	10,4	10,99

A tabela 4 apresenta, também, valores das tensões superficiais e da energia livre global de interação ΔG_{SAS} , que é um critério quantitativo de avaliação da hidrofobicidade, assim si $\Delta G_{\text{SAS}} > 0$ a superfície é considerada hidrofílica.

Strevett e Chen (2003) demonstraram que o valor de γ^- é sempre maior que γ^+ para células bacterianas, isto reforça a teoria de que as células bacterianas têm, predominantemente, caráter doador de elétrons. Segundo Van der Mei e Busscher (1998) as superfícies biológicas são doadoras de elétrons como consequência da presença do oxigênio na atmosfera e da hidratação da superfície da celular.

O caráter hidrofílico da bactéria *Salmonella* Enteritidis foi confirmado pelo valor positivo da energia livre de interação ΔG_{SAS} apresentado na tabela 4.

4.5 Hidrofobicidade foliar versus posição na roseta de alface

A superfície foliar de folhas nas posições externa, intermediária e interna da alface Vitória de Santo Antão, apresentam diferentes hidrofobicidades, tabela 5. Sendo a externa e interna hidrofóbicas por serem maiores que 65°, e a intermediária hidrofílica por ter um valor menor a este, segundo a classificação qualitativa (Vogler, 1998).

De acordo com Azeredo (1998), o parâmetro γ^- pode ser um indicador semiquantitativo do grau de hidrofobicidade. Para valores de $\gamma^- \leq 25,5 \text{ mJ} / \text{m}^2$ a superfície é hidrofóbica, independente do valor da componente apolar. Quando $25 < \gamma^- < 35 \text{ mJ} / \text{m}^2$ a hidrofobicidade é dependente da componente apolar, neste caso, a superfície é hidrofílica quando $\gamma^{\text{LW}} \leq 45 \text{ mJ} / \text{m}^2$ e hidrofóbica quando $\gamma^{\text{LW}} \geq 46 \text{ mJ} / \text{m}^2$. Com base nestes critérios, podemos afirmar que, pelos valores da tabela 5, as superfícies das folhas na posição externa e interna são hidrofóbicas e as intermediárias são hidrofílicas.

Tabela 5 Ângulos de contato e tensão interfacial de folhas de alface cv. Vitória de Santo Antão.

Posição	Ângulos de contacto θ			Tensão superficial ($\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$)			ΔG ($\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$)
	$\theta_{\text{Água}}$	$\theta_{\text{Formamida}}$	$\theta_{\text{Br-naft.}}$	γ^{LW}	γ^-	γ^+	ΔG_{SAS}
Externa	89,2	52,6	53,6	27,9	0,1	4,2	-57,1
Interna	71,6	46,2	39,8	34,6	7,6	1,6	-37,5
Intermediária	64,9	69,3	49,8	29,8	33,6	0,4	12,0

O carácter hidrofóbico e hidrofílico das folhas nas diferentes posições e confirmado com os valores obtidos para ΔG_{SAS} .

As diferenças no carácter hidrofóbico das folhas segundo a posição na roseta podem ser explicadas devido às diferenças na composição da superfície foliar e sua relação com as propriedades físico-químicas (OLIVEIRA, 2006).

4.6 Adesão de *Salmonella* Enteritidis em folhas de diferente posição na roseta da alface

A adesão de *S. Enteritidis* entre folhas da posição externa, intermediária e interna, foi significativamente diferente ($p < 0,05$). As folhas da posição externa e interna foram iguais, e superiores à intermediária. Essa relação foi também observada com a hidrofobicidade das folhas em razão da posição na roseta.

Os valores de energia livre de adesão são coerentes com os ângulos de contato obtidos, indicando que o sistema de adesão é favorável nas folhas interna e externa, por serem hidrofóbicas e desfavoráveis na folha intermediária por ser hidrofílica (Tabela 6).

Tabela 6 Adesão de *Salmonella* Enteritidis na superfície de alface cv. Vitória de Santo Antão em três diferentes posições da roseta

Posição na roseta	Adesão de S.E. Log ufc/cm ²	θ_A° na folha	$\Delta G_{adesão}$
Interna	7,75 a	71,6 b	-10,57
Externa	7,51 a	89,2 a	-24,65
Intermediária	7,00 b	64,9 b	-8,15

*Médias com a mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). θ_a° = Ângulo de contato com água.

A adesão relacionada à hidrofobicidade e hidrofiliabilidade da superfície de suporte e à superfície de diversas bactérias, tem mostrado que é altamente facilitada quando interagem superfícies hidrofóbicas. É menor, entre suportes hidrofóbicos e bactérias hidrofílicas, e dificultada quando as ambas superfícies são hidrofílicas (LIU et al., 2004, ASSANTA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

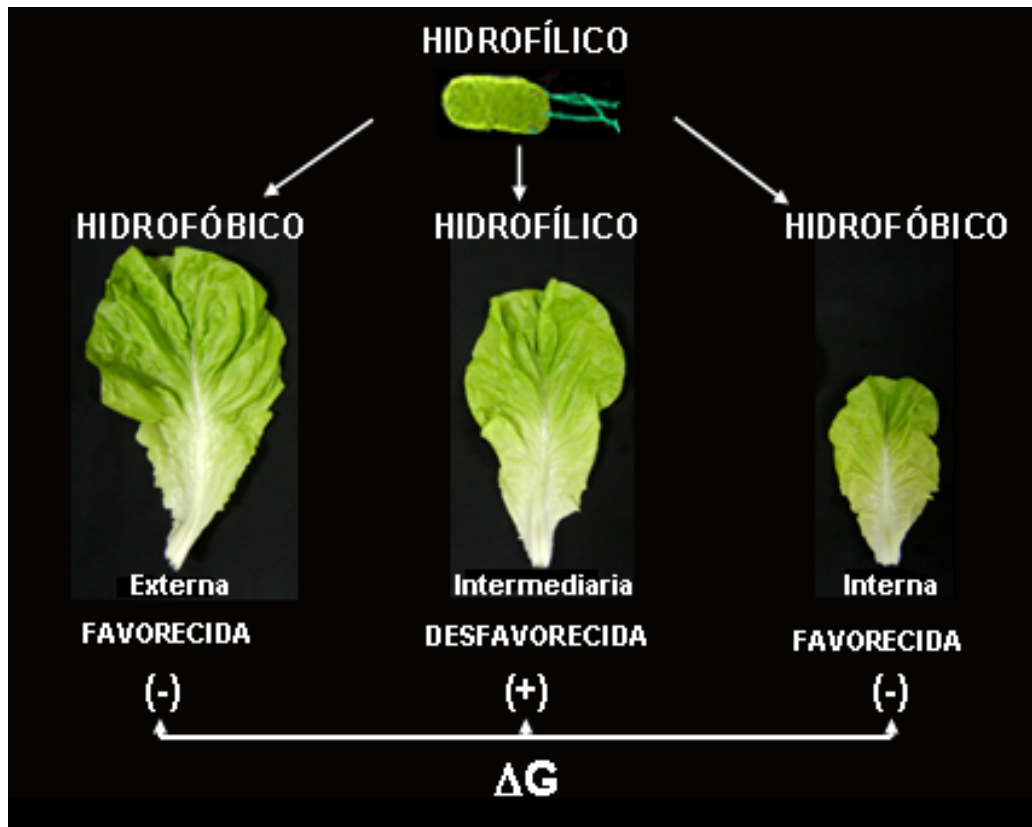


Figura 7. Figura esquemática da interação de adesão de bactéria hidrofílica com superfícies de alface hidrofóbica e hidrofílica.

4.7 Eficiência bactericida do Cloreto de Benzalcônio (BAC)

A eficiência bactericida do cloreto de benzalcônio (BAC) não mostrou resposta linear com o aumento da concentração entre (300 e 2000 mg·L⁻¹), (Gráfico 1). Das concentrações de BAC testadas somente 1200 e 1500 mg·L⁻¹ lograram reduções decimais (RD) de 1,20 significativamente ($p < 0,05$) superiores aos outros tratamentos com BAC.

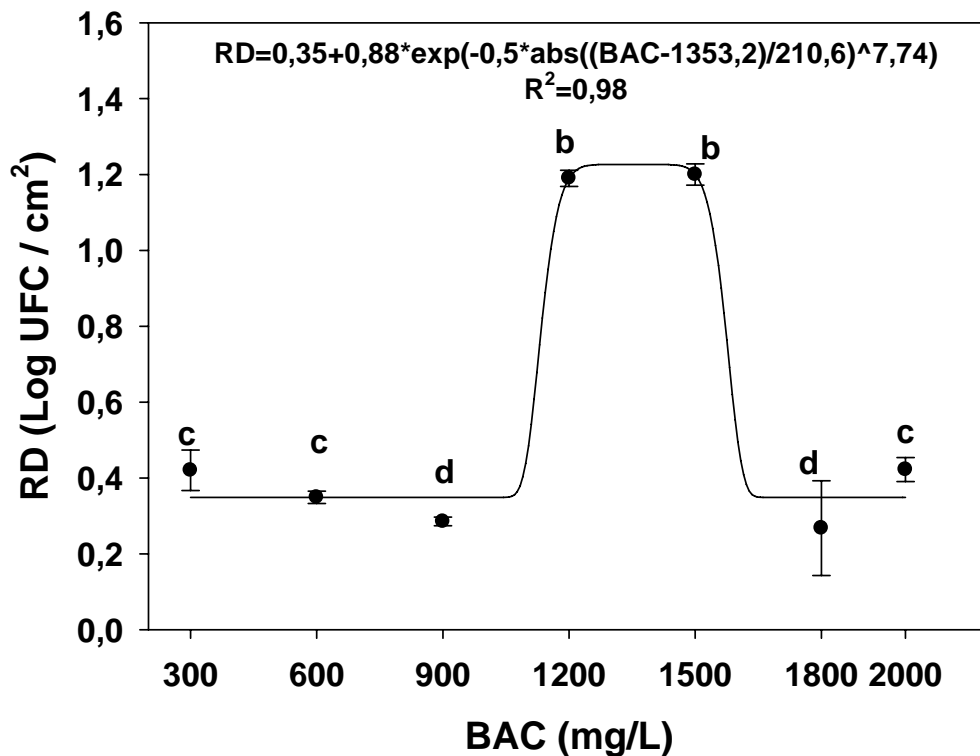


Figura 8. Redução decimal de UFC / cm² de células sésseis de *Salmonella* Enteritidis da superfície foliar de alface cv. Crespa, com concentrações crescentes de Cloreto de Benzalcônio (BAC) e 10 minutos de contato a 22 °C. Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Dados ajustados a uma equação Gaussiana modificada de 5 parâmetros.

Concentrações menores que 900 mg·L⁻¹ reduziram entre 0,27 e 0,42 RD. Incrementando a concentração de BAC desde 1800 a 2000 mg·L⁻¹ o número de reduções obtidas foi de 0,27 e 0,42 respectivamente valores iguais a os obtidos para concentrações menores que 900 mg·L⁻¹ de BAC.

A menor capacidade bactericida obtida com maiores concentrações que 1500 mg·L⁻¹ de BAC, pode ter relação com a proximidade ao valor da concentração micelar crítica (CMC) do surfactante que é de 1870 mg·L⁻¹ (SMITH et al., 2002). Na CMC, a quantidade de monômeros em solução pode se reduzir pela formação de micelas entre as moléculas de BAC, o que diminuiria a concentração de monômeros com capacidade bactericida (MACHADO, 2005).

Incrementos na concentração de BAC até 2000 mg·L⁻¹ aumentariam a quantidade de monômeros livres, mesmo que a maior parte das moléculas esteja na

forma de micelas. Isso explicaria o pequeno aumento do valor da redução decimal observada com 2000 mg·L⁻¹ de BAC versus a concentração de 1800 mg L⁻¹.

O dicloroisocianurato de sódio (DCS) foi mais eficiente ($p < 0,05$) do que todos os tratamentos com BAC sobre as células aderidas. A ação desses sanitizantes é dependente do pH e da concentração de HClO. A forma não dissociada (HClO) apresenta maior ação bactericida. Por isso, soluções com pH baixo do e pKa do HClO (7,5 a 30 °C) serão mais bactericidas. O HClO não tem carga elétrica e, por isso, atravessa com facilidade a membrana celular, atingindo o citoplasma, onde atua pelo processo de oxidação de enzimas da via glicolítica (ANDRADE, 2007).

A porção hidrofóbica dos monômeros do BAC interage com os lipídios da parede e principalmente da membrana celular bacteriana, podendo conduzir à lise celular mediante o extravasamento de componentes do citoplasma, além da interação da parte catiônica do surfactante com os fosfatos das proteínas da célula bacteriana (CAMPANAC et al., 2002).

Elevadas concentrações BAC (Figura 8) reduziram pouco a população de *S. Enteritidis*, nesse experimento. Uma explicação a este fato pode estar relacionada à resistência específica dos microrganismos Gram-negativos aos tensoativos catiônicos, como é o caso do cloreto de benzalcônio.

Em 30 segundos de ação, 100 mg · L⁻¹ de BAC reduziram em 6,0 log UFC / mL a população de *E. coli* ATCC 11229 e *E. coli* O157 ATCC-43890 em suspensão, ou seja, na forma planctônica (SILVA et al., 2003). Sabe-se que, os sanitizantes são mais eficientes sobre bactérias em suspensão do que quando aderidas nas superfícies, ou seja, na forma sésil. Neste sentido, Velásquez (2009) relatou reduções decimais de 1,54 para *Yersinia enterocolitica* e 0,39 para *E. coli* O157:H7 aderidas em alface, utilizando 100 mg L⁻¹ de BAC por um minuto de contato.

Deste modo, observa-se que o maior desempenho bactericida do BAC pode ser influenciado pelo tipo de microrganismo, o meio onde se desenvolve o tempo de contato e o maior número de monômeros em solução com capacidade bactericida. Consequentemente, para obter 1,2 reduções decimais de *S. Enteritidis* aderida na superfície de alface, concentrações entre 1200 a 1500 mg · L⁻¹ de BAC, se requer 10 min de contato.

4.8 Eficiência bactericida do Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

A eficiência bactericida do Dodecil sulfato de Sódio (SDS) descreveu uma relação inversa entre a concentração e a redução decimal. Observa-se que as maiores reduções decimais se atingem com menores concentrações de SDS. Assim, concentrações de 600 e 1200 mg·L⁻¹ de SDS conseguiram 0,76 e 0,83 reduções decimais significativamente superiores ($p < 0,05$) às demais concentrações utilizadas (Figura 9).

As menores reduções obtidas com concentrações superiores a 1500 mg·L⁻¹ podem estar relacionada à proximidade da concentração micelar crítica de micela (CMC) do SDS, onde as micelas se encontram em equilíbrio com os monômeros do surfactante, um aumento da concentração do surfactante, reduzindo assim a sua capacidade bactericida.

Essa tendência do SDS em diminuir sua capacidade bactericida com o aumento da concentração foi verificada em testes prévios, avaliando-se concentrações entre 1400 e 8650 mg·L⁻¹, indicando uma relação inversa entre a capacidade bactericida e a concentração desses surfactantes entre os níveis avaliados.

Constata-se que, tanto o SDS quanto BAC apresentaram maior eficiência sobre a *S. Enteritidis* em concentrações abaixo da CMC. Apesar de o SDS ter demonstrado capacidade bactericida, a diminuição na população de *S. Enteritidis* não atingiu as 3 reduções decimais recomendadas para a ação sanitizantes sobre células sésseis (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

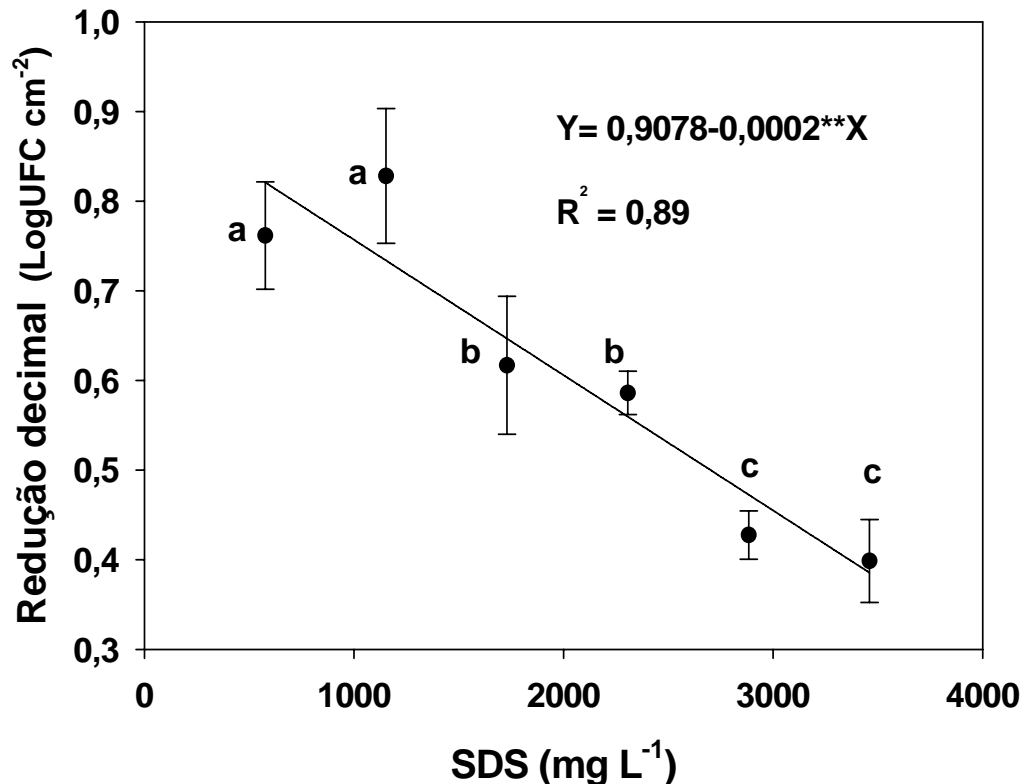


Figura 9. Redução decimal de UFC cm⁻² de células bacterianas sésseis de *Salmonella* Enteritidis da superfície foliar de alface cv. Crespa, a diferentes concentrações de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 10 min de contato a 22 °C. Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Cada ponto provém de cinco observações duplicadas. Significativo a $p \leq 0,01$ pelo teste de t, na equação de regressão.

4.8.1 Eficiência do SDS versus tempo de contato

O incremento do tempo de contato bactéria sésil-SDS em concentração constante de 1200 mg L⁻¹, não mostrou diferenças com o aumento do tempo entre 5 e 60 minutos (Figura 10), indicando que a eficiência sanitizante não responde a incrementos do tempo de tratamento. Esse fato pode ser relevante devido a que na rotina da higienização na indústria de alimentos procura-se usar tempos menores de contato entre detergentes e superfícies. Isto permite hipotetizar que o uso do SDS em combinação seqüencial com outros sanitizantes pode ser uma estratégia a ser considerada.

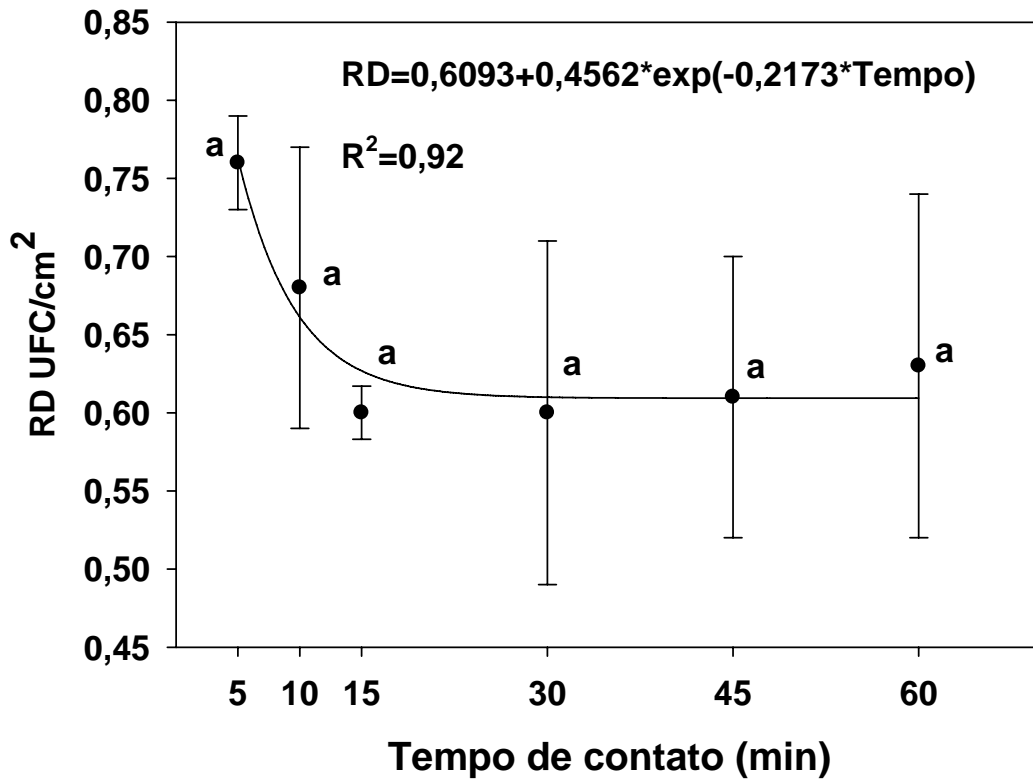


Figura 10 Influência do tempo de contato na diminuição da população de *Salmonella* Enteritidis aderida à superfície de alface cv. Verônica Crespa com 1153,4 mg·L⁻¹ de SDS a 22 °C. Letras iguais nas coordenadas não diferem pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

5 CONCLUSÕES

A adesão de *Salmonella* Enteritidis sobre superfícies de folhas de alface foi influenciada pelo caráter e magnitude hidrofóbica da superfície foliar de alface, sendo que a hidrofobicidade varia com o estágio de desenvolvimento da planta.

A adesão foi maior nas folhas internas e externas que se apresentaram como hidrofóbicas. Já as folhas intermediárias apresentaram menor adesão e foram caracterizadas como hidrofílicas, em concordância com os aspectos termodinâmicos que regem a adesão bacteriana.

No processo de adesão, a temperatura e o tempo foram aditivos, com maior influência da temperatura. Isso ratifica a conveniência da utilização de baixas temperaturas como mecanismo de controle do desenvolvimento de microrganismos patogênicos, como *S. Enteritidis*.

As soluções de cloreto de benzalcônio (BAC) e dodecil sulfato de sódio (SDS) apresentaram menor eficiência na remoção de *Salmonella* Enteritidis, em relação a soluções de dicloroisocianurato de sódio. Os surfactantes tiveram melhores desempenhos em concentrações menores que as suas respectivas concentrações micelares críticas (CMC). No caso do surfactante catiônico (BAC) são necessárias concentrações elevadas ($1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) do surfactantes para reduzir as populações de *Salmonella* Enteritidis.

A capacidade bactericida do SDS sobre *S. Enteritidis* é inversamente proporcional a sua concentração e não é melhorada com o aumento do tempo de contato, na faixa entre 5 e 60 minutos.

Soluções de SDS podem ser alternativas e usadas como detergente no procedimento de higienização de folhas de alface, desde que, alterações indesejáveis na alface, relacionadas aos aspectos toxicológicos e sensoriais não ocorram.

6 REFERÊNCIAS

ABUSHELAIBI, A.; SOFOS, J.N.; SAMELIS, J.; KENDALL, P.A. Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, Milk or apple juice and stored at 4 °C, 15 °C and 25 °C. **Food Microbiology**, v.20, p.17-25, 2003.

ADAMS, M. R.; MOSS, Y. M. O. **International Journal Food microbiology**. 2. ed., Cambridge: the Royal Society of Chemistry, p. 258-263, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, Ministério da Saúde. Resolução RE nº 666 de 9 de maio 2001. Autoriza inclusão das substâncias cloretos de N-N dialquil dimetil amônio, sendo alquil radicais de C8 a C16, no subanexo 1-itens outros e no subanexo 2 item 2 “desinfetantes de uso geral”. **Diário oficial da União de 14 de maio de 2001**.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J.C. **Adesão e formação de biofilmes microbianos**. In ANDRADE, N. J. Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008, cap1, p.15 -60.

APHA. Compendium of methods for the Microbiological examination of foods. Edited by Frances Pouch Downes, Keith ITO. **American Public Health Association**, 2001.

ASSANTA, M.A., ROY, D., LEMAY, M.J., MONTPETIT, D., "Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces", **Journal of Food Protection**, Vol. 65 p.1240-7,2002.

AZEREDO, J. C.; **Adesão de Microrganismos e Composição da Matriz de Bioagregados. Desenvolvimento de Técnicas e Estudo da influência de Exopolímeros**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Braga, Portugal. 1998.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. **Biofouling**.16, p. 17-27, 2002 .

BERNARDES, C. P. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão**. 2008. 56f. Tese (Magister Scientiae em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Mg, 2008.

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

BOVILL, R.; BEW, J.; BARANYI, J. Measurements and prediction of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature II. Rapidly changing temperatures. **International Journal of Food Microbiology** 67, 2001.

BUCHANAN, B.B.; GRUISEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**. 2000. 1367p.

BRANDL, M. T.; ADMUNSON, R. Leaf Age as Risk Factor in Contamination of Lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, p.2298-2306, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 de jan., 2001. Seção I, p. 45-53.

BREWER, C.A.; SMITH, W.K.; VOGELMANN, T.C. Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. **Plant Cell Environ.** v14:955–962, 1991.

BUSSCHER, H. J., A. H. WEERKAMP, H. C. VAN DER MEI, A. W. J. van Pelt, H. P. de Jong, and J. Arends. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. **Appl. Environ. Microbiology**. v 48, p 980-998, 1984.

CAMPANAC, C. PINEAU, L.; PAYARD, A.;BAZIARD-MOUYESSET, G.; ROQUES, C. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v.46, p.1469-1474, 2002.

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

CHARACKLIS, W.G. Laboratory biofilm reactors. In: CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. (Eds.). *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, 1990.

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

CHURAEV, N. V.; STARKE, G.; ADOLPHS, J. Isotherms of Capillary Condensation Influenced by Formation of Adsorption Films: 1. Calculation for Model Cylindrical and Slit Pores. **Journal of Colloid and Interface Science**. Volume 221, Issue 2, 15, p. 246-253. January 2000.

DERJAGUIN, B. W., LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sots and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochimie*, v. 14, p. 633-662, 1941.

ELIMELECH, M.; GREGORY, J.; GIA, X.; WILLAMS, R. **Particle deposition and aggregation-measurements, modeling and simulation**. Oxford. Colloid and surface engineering series, Butterworth-Heinemann Ltda., 1995.

ENSIKAT H.J.; BOESE M.; MADER W.; BARTHLOTT W.; KOCH K. **Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffraction studies**; *Chemistry and physics of lipids* 144, p.45-49, 2006.

ERCOLANI, G.L., **Differential survival of Salmonella typhi, Echerichia coli and enterobacter aerogenes on lettuce in the Field**. *Zbl. Bekt. Abt.A* 134: 402-411,2005.

ESUMI, K.; SAKAGAMI, K.; KUNYASU,S.; NAGATA, Y.; SAKAI, K.; TORIGOE, K. Simultaneous Adsorption of Sugar-Perstituted Poly(amidoamine) Dendrimers and Anionic Surfactant at the Alumina/Aqueous Solution Interface. **Langmuir**. 16, 10.264 -10.268, 2000.

FLOWERS, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. Salmonella. In: DOWNES, F. P., ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4a ed. APHA, cap. 37, p. 357-380, 2001.

GARDENER, W.P., GIRARD, J.E. Analysis or Common Household Cleaner Desinfetante by capillary Electroforesis, **Journal of chemical education**.10.1335-1338, 2000.

GARRETT. T.R. and BHAKOO M.; ZHANG Z.;Bacterial adhesion and biofilms on surface *Progress in Natural science*., 18; 1049-1056; 2008.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration e Biodegradation**. v 51, p 245-248, 2003.

GOTO, R.; TIVELLI, S.W. **Produção de Hortaliças em Ambiente Protegido: Condições Subtropicais**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP,1998.

GUPTA, S. K.; NALLUSWAMI, K.; SNIDER, C.; PERCH, M.; BALASEGARAM, M.; BURMEISTER, D. Outbreak of Salmonella Braender up infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, **Epidemiology and Infection**, Feb 5, 2004.

HARRISON, I.M.; CANDAU, F.; ZANA, R. Interactions between polyampholytes and ionic surfactants. **Colloid and polymer science**. vol. 277, no1, p. 48-57. 1999.

HOUARI, A.; DI MARTINO, P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation, **Letters in Applied Microbiology** 45, pp. 652–656. 2007.

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

ISLAM, M.; MORGAN, J.; DOYLE, M.P.; PAHTAK, S.C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Persistence of Salmonella enterica serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Foodborne Pathogenic**. 1: 27-35. 2004.

JAY, J.M. **Microbiologia de los Alimentos**, Editorial Acribia 471-490, 2005.

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

LIMA, P.S. **Influencia da microbiota na adesão de Salmonella Enteritidis sobre alface (Lactuca sativa L.)**. 2008. 56f. Tese (Magister Scientiae em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2008.

LIU, Y.; YANG, S. F.; LI, Y.; XU, H.; QIN, L.; TAI, J.H. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. **Journal of Biotechnology**, 110, 251-256. 2004.

LUTEY, R. W. Process cooling water. In: **Hand book of biocides and preservative**. Use ed. Rossmore, H. W. 50-82. London. Blackie Academic and Professional, 1995.

MACHADO, S.M.O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalconio no controle da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do ambiente) – Universidade do Minho. Braga, 2005.

MANGALAPPALLI-ILLAHTU, A.; KORBER, D.R. Adaptive Resistance and Differential Protein Expression of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Biofilms Exposed to Benzalkonium Chloride. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Nov. 2006, p. 3588-3596.

MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society Microbiology News**, v. 58, n. 4 p. 202-207, 1992.

MORETTI, C.L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**, Brasília: Embrapa Hortaliças e SEBRAE, 2007. 531p.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

MORRIS, C.; MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. 41: 429–53 doi: 10.1146/annurev.phyto.,2003.

MCDONNELLI, G., RUSSELL, A. D. **Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance**. *Clinic Microbiology Review*. v 12, p 147-179, 1999.

OLIVEIRA, K. M. P. **Adesão de *Salmonella* Enteritidis em diferentes superfícies de processamento de alimentos**. Londrina, PR: UEL, 2006. 113p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology** (2007) 38:318-323.

PURPERIO E AZEVEDO FILHO, Boletim, 200 **Instituto agrônômico - IAC** centro de análise e pesquisa tecnológica do agronegócio de horticultura, 2005.

REINA, L.; FLEMING, H.; BREIDT, F. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. **Journal of Food Protection**, Vol. 65, No. 12, 2002, pages 1881-1887.

RUSSELL, A. D.; MCDONNELL, G. Concentration: a major factor in studying biocide action. **Journal of Hospital Infection**. v 44, p 1-3 ,2000.

RYU J.H; BEUCHAT L.R. Factors affecting productions .of extra cellular carbohydrate complexes by Echerichia coli O157:H7.; **International Journal of Food Microbiology** ; 95. 189-204. 2004.

SANTANA R.R.; CARVALHO C; C. LEITE ALCANTARAL. M. **Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa* L.) de diferentes sistemas de cultivo**, 2007.

SANTOS, E.A.J.D.. **Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria com modelos matemáticos**. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. p. 220 ,España, 2007.

SERRA, J.L. Contaminação de alfaces *Lactuca Sativa* L.; in natura por a enterobacterias **congresso Brasileiro de Química**. Salvador /BA de 25 a 29 de setembro de 2006.

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

SILVA, N. Ocorrência de escherichia coli O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23:p.167-173, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, p -259,1997.

SILVA N.; SILVEIRA, N.F.A.; YOKOYA F.; OKAZAKI M.M.; Ocorrência de Escherichia coli O157:H7 em vegetais e Resistência aos agentes de desinfecção de verduras. Ciências e tecnologia de alimentos. Campinas, v.23: p. 167-173, 2003.

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

STREVETT, K.A.: CHEN, G. Microbial surface termodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 329-335, 2003.

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

TAHA, M, O.; NASSER, W.; ARDAKANI, A.;ALKHATIB, H. Sodium lauryl sulfate impedes drug release from zinc-crosslinked alginate beads: Switching from enteric coating release into biphasic profiles. **International Journal of Pharmaceutics** 350 (2008) 291-300.

TAIZ, L. and ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 ed.: Artmed 719 p. 2004.

TAKEUCHI, K., MATUTE, C.M., HASSAN, A.N; FRANK, J.F. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. **Journal of Food Protection**, v 63, p 1433–1437, 2000.

TAVARES, J.; SARAIVA, F. Z. Disponível em [http://www.fag.edu.br/tcc/2006/Nutricao/\(QUALIDADE%20MICROBIOLOGICA%20E%20COMPOSI_307A%20O%20QUIMICA%20DA%20ALFACE%20.pdf](http://www.fag.edu.br/tcc/2006/Nutricao/(QUALIDADE%20MICROBIOLOGICA%20E%20COMPOSI_307A%20O%20QUIMICA%20DA%20ALFACE%20.pdf) > Acesso em 21nov. 2008.

UBBINK, J.; ZAMMARETTI, P.S. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid an Interface Science**, v. 12, p.263-270, 2007.

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

VAN DER MEI, BOS, R.; BUSSCHER, H. J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity base don contact angles. **Colloids and Surfaces**, v. 11, p. 213 -221, 1998.

VAN DER ZANT, C.; SPLITTSTOESSER, F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington DC: American Public Health Association; 1992. p.593-604.

VAN OSS, C. J. The forces involved in bioadhesion to flat surface and particles, their determination and relative roles. **Biofouling**, v. 4, 25-35, 1991.

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity and Hydrophilicity of Biosurfactants. **Current Opinion Colloids International Science**,v 2, p 503-512, 1997.

VAN OSS, C. J.; CHAUNDHURY, M. K.; GOOD, R. J. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. **Chemical Reviews**, v. 88, p. 927-941, 1998.

VELÁZQUEZ, L. C.; BARBINI, N.; ESCUDERO, M.; ESTRADA, C.L.; GUZMÁN A.M.; Evaluation of chloride, and lactic acid as sanitizers for reducing *Eschericia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. **Food Control** v.20 p. 262-268, 2009.

VERWEY, E.J.W.; OVERBEEK, J.T.G. **Theory of the Stability of Lyophobic Colloids**. Elsevier, Amsterdam, 225 p. 1948.

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