JACKLINE FREITAS BRILHANTE DE SÃO JOSÉ

SANITIZAÇÃO POR ULTRASSOM E AGENTES QUÍMICOS NO PROCESSAMENTO MÍNIMO DE HORTALIÇAS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S239s
2009

São José, Jackline Freitas Brilhante de, 1983-
Sanitização por ultrassom e agentes químicos no processamento mínimo de hortaliças / Jackline Freitas Brilhante de São José. – Viçosa, MG, 2009.
xii, 88f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.
Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 60-81.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Hortaliças - Processamento mínimo. 3. Hortaliças - Microbiologia. 4. Ultrassom. 5. Desinfecção e desinfetantes. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.001579

JACKLINE FREITAS BRILHANTE DE SÃO JOSÉ

SANITIZAÇÃO POR ULTRASSOM E AGENTES QUÍMICOS NO PROCESSAMENTO MÍNIMO DE HORTALIÇAS

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

Aprovada: 27 de julho de 2009.

_____	_____
Prof. Rolf Puschmann	Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
(Co-orientador)	(Co-orientadora)
_____	_____
Prof. Nélio José de Andrade	Profª Elisabete Fantuzzi

_____

Profª. Maria Cristina Dantas Vanetti

(Orientadora)

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer."

(Amyr Klink)

À Deus.

AGRADEÇO

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo amor, dedicação,

apoio incondicional e total incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai de infinita bondade, que permitiu que chegasse até aqui, iluminando meu caminho e me concedendo força para superar cada dificuldade;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade e pelo grandioso aprendizado;

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

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela confiança, compreensão, incentivo, e principalmente pelo apoio e ensinamentos;

Ao Professor Rolf Puschmann e a Dra. Cláudia Lúcia, pesquisadora da EPAMIG, pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção fornecidos;

Ao Professor Nélio José de Andrade e a Professora Elisabete Fantuzzi pela participação na defesa;

Aos professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos;

À Professora Catarina por auxiliar no uso do Microscópio de Epifluorescência do Laboratório de Associações Micorrízicas;

À Dra. Cláudia Alencar Vanetti, técnica responsável pelo Núcleo de Microanálise e Microscopia, pela ajuda e ensinamentos durante as observações no microscópio eletrônico de varredura;

À empresa Tech Desinfecção, por ceder o produto Proxitane 1512;

À empresa Veros Produtos Químicos Ltda, por ceder o produto Veromax 80;

Aos meus pais, José Antônio e Maria da Conceição, pelo amor, apoio, incentivo e confiança em todos os momentos;

Ao meu querido irmão, Jackson, pelo apoio, incentivo e conselhos;

À minha Tia Eliana, que me incentivou em meus primeiros passos na área de qualidade de alimentos;

A todos meus familiares, pelo apoio e carinho;

Ao Raphael pelo amor, companheirismo, apoio e paciência;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Laboratório de Patógenos Alimentares e do Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, Adriana Ponce, Adriana Santos, Ana Íris, Cláudia, Danielle, Emilene, Evandro, Gardênia, Natan, Ramila, Simone, Solimar, Camila, Carla, Renata, Aline, Fernanda, Ana Andréa, Anna Gabriela, Déborah, Juliana, Marcelo e Henrique pelo companheirismo, apoio e amizade;

Às todas amigas da Nutrição, em especial à Daniela e Hatanne, pelo apoio, incentivo, torcida e amizade;

À todos colegas de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela convivência agradável durante estes dois anos;

Às professoras, Helena Maria Pinheiro Santana, Sônia Ribeiro, Sílvia Eloiza Priore, Ana Íris Mendes Coelho e ao professor João Carlos Bouzas Marins, pelo incentivo e apoio desde os tempos de graduação;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Nilcéa, Laura, Cássia, Sr. Cezário, José Carlos e Pablo, pela atenção e preciosa ajuda;

Enfim, a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JACKLINE FREITAS BRILHANTE DE SÃO JOSÉ, filha de José Antônio Brilhante de São José e de Maria da Conceição Freitas de São José, nasceu em Viçosa, Minas Gerais no dia 26 de setembro de 1983.

Em maio de 2002 iniciou o curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em março de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

RESUMO ix
ABSTRACT xi
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1. Processamento mínimo de frutas e hortaliças 3
2.2. Sanitizantes usados na indústria de processamento mínimo 6
2.3. Utilização do ultrassom como alternativa na etapa de sanitização 14
2.4. Ocorrência de patógenos em hortaliças e frutas minimamente processadas 17
3. MATERIAL E MÉTODOS 24
3.1. Preparo da matéria-prima e sanitização das hortaliças minimamente processadas 24
3.2. Análise de pH 25
3.3. Análises microbiológicas das hortaliças minimamente processadas 26
3.3.1. Contagem padrão de mesófilos aeróbios 26
3.3.2. Contagem padrão de fungos filamentosos e leveduras 27
3.4. Contagem de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja 27
3.4.1. Preparo do tomate cereja 27
3.4.2. Contaminação intencional dos tomates cereja 27
3.4.3. Quantificação de células aderidas 28
3.5. Observações microscópicas de células de *Salmonella* aderidas à superfície de tomate cereja 29
3.5.1. Preparo de cortes de tomate cereja 29
3.5.2. Preparo do inóculo 29
3.5.3. Microscopia de epifluorescência 30
3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura 30
3.6. Delineamento experimental 31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4.1. Alterações de pH e de características sensoriais em hortaliças após tratamentos de sanitização 33

4.2. Efeito dos tratamentos de sanitização na microbiota contaminante de hortaliças minimamente processadas 36
4.3. Adesão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 à superfície de tomate cereja 48
5. CONCLUSÕES 58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60
7. APÊNDICES 82

RESUMO

SÃO JOSÉ, Jackline Freitas Brilhante, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Sanitização por ultrassom e agentes químicos no processamento mínimo de hortaliças.** Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadores: Rolf Pushmann e Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a utilização do ultrassom na etapa de sanitização de hortaliças minimamente processadas. As hortaliças usadas foram agrião, salsa, morango e tomate cereja, as quais foram submetidas a tratamentos com ultrassom (45 kHz), por 10 minutos, associado ou não aos agentes químicos dicloroisocianurato de sódio, nas concentrações iguais a 50 $mg.L^{-1}$ e 200 $mg.L^{-1}$, peróxido de hidrogênio a 5%, ácido peracético a 40 $mg.L^{-1}$ e dióxido de cloro a 10 $mg.L^{-1}$. Comparou-se a redução da contaminação inicial das hortaliças por mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras. Após a sanitização, foram observadas alterações de valor de pH, coloração e odor. O tratamento que resultou em maior remoção de contaminantes foi avaliado em tomate cereja intencionalmente contaminado com células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 na concentração entre 10^6 e 10^7 UFC. L^{-1}. Os tomates contaminados foram incubados por 48 horas para permitir adesão das células e, após esse período, foram submetidos aos tratamentos de sanitização com dicloroisocianurato de sódio a 50 e 200 $mg.L^{-1}$, ácido peracético 40 $mg.L^{-1}$, ultrassom (45 kHz) e ultrassom combinado com ácido peracético 40 $mg.L^{-1}$. A quantificação das células aderidas foi feita por contagem de colônias em ágar *Salmonella Shigella* (SSA). A observação de células de

Salmonella aderidas à superfície de tomates cereja foi feita em microscópio de epifluorescência e microscópio eletrônico de varredura. As comparações dos dados foram feitas por análise de variância ANOVA ($p < 0,05$), e em seguida, foi avaliada a diferença entre às médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dicloroisocianurato de sódio a 200 $mg.L^{-1}$ e dióxido de cloro a 10 $mg.L^{-1}$ combinados ao tratamento com ultrassom, promoveram maior redução da contagem inicial de mesófilos aeróbios comparado à soma das reduções dos tratamentos de forma isolada, o que indicou um efeito sinérgico. Constatou-se que a combinação dos tratamentos com ácido peracético a 40 $mg.L^{-1}$ e ultrassom permitiu redução de 4,5 a 6,5 log $UFC.g^{-1}$ e de 3,5 a 4,5 log $UFC.g^{-1}$ da população de mesófilos aeróbios e de fungos e leveduras, respectivamente. Apesar da considerável redução na microbiota contaminante, este sanitizante, combinado ou não ao ultrassom, alterou a coloração dos morangos. O tratamento com ultrassom e ácido peracético a 40 $mg.L^{-1}$ reduziu 3,88 log $UFC.g^{-1}$ na população de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja. O tratamento com ultrassom por 10, 20 e 30 minutos reduziu 0,83, 1,22 e 1,73 log UFC. g^{-1} ($p < 0,05$), respectivamente essas células aderidas, o que foi confirmado pela microscopia de epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados apontaram a importância do uso do ultrassom como um processo auxiliar na etapa de sanitização das hortaliças estudadas.

ABSTRACT

SÃO JOSÉ, Jackline Freitas Brilhante, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Sanitization with ultrasound and chemical agents in minimally processed vegetables.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Rolf Pushmann and Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto.

This study aimed to evaluate the use of ultrasound in sanitization of minimally processed vegetables. Watercress, parsley, strawberry and cherry tomatoes were subjected to with a 10 minute ultrasound (45 kHz) treatment, with or without chemical agents. Sodium dichloroisocyanurate at 50 $mg.L^{-1}$ and 200 $mg.L^{-1}$, 5% hydrogen peroxide peracetic acid at 40 $mg.L^{-1}$ and chlorine dioxide were used as chemical agents. The reduction of the initial contamination of vegetables by aerobic bacteria plate count and moulds and yeasts was determinate. After sanitization, changes in pH value, color and odor were evaluated. The treatment which resulted in greater contaminant removal was evaluated for the cherry tomato intentionally contaminated with *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 cells at concentrations ranging from 10^6 to 10^7 CFU. L^{-1}. The contaminated tomatoes were incubated for 48 hours to allow cell adhesion and then subjected to sanitization treatments with chlorinated water at 50 and 200 $mg.L^{-1}$, peracetic acid at 40 mg L^{-1}, ultrasound (45 kHz) and ultrasound combined with peracetic acid at 40 mg $L^{-1.}$ The quantification of the adhered cells was performed by counting colonies on *Salmonella Shigella* (SSA) agar. *Salmonella* cells adhered to the surface of cherry tomatoes was observed on an epifluorescence microscope and

scanning electron microscope. All comparisons were made by ANOVA ($p < 0.05$). Then, the difference between the averages were analyzed by means of the Tukey test ($p < 0.05$). Sodium dichloroisocyanurate at 200 $mg.L^{-1}$ and chlorine dioxide at 10 $mg.L^{-1}$ combined with ultrasound treatment promoted greater reduction in the initial count of aerobic bacteria if compared to the sum of the reductions of the treatments alone, which indicated a synergistic effect. It was found that the combination treatment with peracetic acid at 40 $mg.L^{-1}$ and ultrasound allowed a reduction of 4.5 to 6.5 log $CFU.g^{-1}$ and 3.5 to 4.5 log $CFU.g^{-1}$ on the population of aerobic bacteria and moulds and yeasts, respectively. Despite the considerable reduction on microbial populations, this sanitizer, combined or not with ultrasound, led to color changes in the strawberries. Ultrasound treatment and peracetic acid at 40 mg L^{-1} showed a reduction of 3.88 log CFU. g^{-1} of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 adhered to the surface of cherry tomatoes. Ultrasound treatments for a period of 10, 20 and 30 minutes reduced CFU. g^{-1} to 0.83, 1.22 and 1.73 log ($p < 0.05$), respectively. The reduction of adhered cells was confirmed by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. The results indicate the importance of the use of ultrasound as an auxiliary technology in sanitization step of the vegetables studied.

1. INTRODUÇÃO

As mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores, a busca por alimentos mais saudáveis, convenientes e práticos no momento da compra e do consumo, resultaram em aumento na demanda pelo consumo de frutas e hortaliças minimamente processadas. Considerando a possibilidade de contaminação por micro-organismos deterioradores e patogênicos em diversos pontos da cadeia do processamento mínimo, o controle microbiológico desse tipo de produto torna-se essencial.

A operação de lavagem associada à sanitização é considerada a etapa crítica para redução no número de micro-organismos nesses produtos. O cloro é o sanitizante mais usado pela indústria de alimentos, inclusive pela indústria de processamento mínimo em função da facilidade de uso, baixo custo, atividade antimicrobiana reconhecida e completa dissolução em água. Entretanto, a redução no número de contaminantes da superfície de frutas e hortaliças é limitada e ainda, o uso do cloro gera a formação de subprodutos tóxicos pela combinação da matéria orgânica com compostos clorados.

Os registros de ocorrência de surtos associados a esses produtos demonstram que o controle microbiológico continua a ser um desafio para a indústria de alimentos. A capacidade de adesão de micro-organismos patogênicos, como *Salmonella*, a superfície de frutas e hortaliças, mostra a necessidade de estudos e de desenvolvimento de novas

estratégias que busquem contribuir para a segurança microbiológica do produto que chega ao consumidor.

O ultrassom é uma tecnologia recomendada na indústria de alimentos com diferentes aplicações, dentre elas, a remoção de partículas aderidas a superfícies e a inativação de micro-organismos. Há indícios que essa tecnologia associada à sanitizantes permite maior redução da contaminação microbiana de alimentos.

Considerando a necessidade de ampliar as estratégias para a redução microbiana em frutas e hortaliças minimamente processadas e a indicação para aplicação do ultrassom, objetivou-se avaliar sua eficiência tanto em aplicação isolada bem como em associação a sanitizante no processamento mínimo de hortaliças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processamento mínimo de frutas e hortaliças

O consumo de frutas e hortaliças tem aumentado significativamente nas últimas décadas em função da sociedade moderna buscar hábitos de vida mais saudáveis (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al*., 2009). No Brasil, o mercado desses produtos também cresceu devido à estabilização da economia, da mudança dos hábitos alimentares dos consumidores e da evolução de sistemas de auto-serviço (HOLTZ, 2006; OLIVEIRA *et al*., 2006).

O valor de R$ 26 bilhões relativos à produção das frutas e hortaliças corresponde a 26% do valor total da produção agrícola do Brasil, inferior apenas ao valor de produção dos cereais, leguminosas e oleaginosas (BRASIL, 2009). O Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo registrou o aumento do valor arrecadado resultante da produção das frutas e hortaliças frescas, não industrializadas no estado entre os anos de 2001 a 2005, que foi de R$ 3 milhões para R$ 5 milhões (HORTIBRASIL, 2009).

As diversas tendências de consumo de alimentos, a busca por alimentos mais saudáveis a serem incluídos na dieta do consumidor (RUÍZ-CRUZ *et al*., 2007; ABADIAS *et al*., 2008a) aliados à praticidade e conveniência proporcionadas pelos

alimentos prontos (VITTI *et al*., 2004; ANTONIOLLI *et al*., 2005; TOURNAS, 2005) contribuíram para o aumento da demanda de frutas e hortaliças minimamente processadas (RICO *et al*., 2007; SREBERNICH, 2007).

A comercialização de produtos minimamente processados no Brasil iniciou-se na década de 90 e, nos últimos anos, este segmento do agronegócio apresentou grande crescimento no mercado (OLIVEIRA, 2005). Embora ainda seja incipiente, nota-se um crescimento rápido no setor nos grandes e médios centros urbanos, tornando-se uma área com importante potencial econômico (ONGENG *et al*., 2006; RICO *et al*., 2008). Este potencial pode ser associado à expansão dos serviços como restaurantes, hotéis, lanchonetes, visto que estes produtos oferecem uma série de vantagens como redução na geração de resíduos como casca e, ou sementes, aumento da qualidade higiênico-sanitária, padronização na forma e tamanho, diminuição nos custos adicionais com mão-de-obra e estrutura física para o processamento e armazenamento da matéria-prima e do produto, redução do tempo gasto com o processamento, entre outros (SILVA, 2001).

O processamento mínimo de frutas e hortaliças refere-se às operações de lavagem, descascamento, corte, sanitização, centrifugação e embalagem, tornando-as prontas para o consumo ou preparo imediato, sem que percam a condição de produto fresco ou *in natura* (PRADO *et al*., 2003). O objetivo do processamento mínimo é proporcionar ao consumidor um produto semelhante ao fresco com vida útil prolongada e, ao mesmo tempo, garantir a segurança microbiológica, mantendo-se a qualidade nutritiva e sensorial (OLIVEIRA *et al*., 2006; RICO *et al*., 2007).

É sabido que o processamento de frutas e hortaliças provoca a aceleração da deterioração fisiológica e por micro-organismos, além de alterações bioquímicas, até mesmo quando apenas operações menos agressivas de processamento são usadas, o que

pode resultar em perda da coloração, textura e sabor (RICO *et al*., 2007; MARTÍN-DIANA *et al*., 2008).

Após o corte, a superfície de hortaliças ou frutas, é exposta ao ar tornando-a vulnerável a desidratação ou alteração de coloração. A condição geral de qualidade, como firmeza e conteúdo de nutrientes, em especial de vitaminas, é influenciada principalmente pela temperatura, pois a taxa de respiração no vegetal é alterada. Durante o corte, o produto também pode ser exposto à contaminação por bactérias, leveduras e fungos (IHL *et al*., 2003).

A qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas está diretamente relacionada à presença de micro-organismos deterioradores, que provocam alterações nas características sensoriais do produto e também, a micro-organismos patogênicos que, em determinada população, podem causar danos à saúde do consumidor (SILVA *et al*., 2006). Micro-organismos são contaminantes naturais de produtos frescos e de minimamente processados e são provenientes de diversas fontes, incluindo cultivo, colheita, manipulação pós-colheita, processamento e distribuição (RICO *et al*., 2007; ABADIAS *et al*., 2008a). Em razão do tipo de processamento aplicado a esses vegetais, pode-se criar um ambiente favorável à multiplicação de micro-organismos deterioradores e de patogênicos (RICO *et al*., 2007).

Apesar do aumento da produção de frutas e hortaliças minimamente processadas, o controle microbiológico desse tipo de produto ainda é um desafio para a indústria (ONGENG *et al*., 2006; RICO *et al*., 2007; LÓPEZ-GÁLVEZ *et al*., 2009). Em razão dessa dificuldade no controle da contaminação, há a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar associadas ao consumo de produtos minimamente processados contaminados (HAN *et al*., 2000; BEUCHAT, 2002; SEYMOUR *et al*., 2002; GARROOD *et al*., 2004; ISLAM *et al*., 2004; DAS *et al*., 2006; ARUSCAVAGE

et al., 2006; ELLS e HANSEN, 2006; LAPIDOT *et al*., 2006; BORDINI *et al*., 2007; FRANZ *et al*., 2007; RUÍZ-CRUZ *et al.*, 2007; ALLENDE *et al*., 2008a; ERKAN e VURAL, 2008; KIM e LINTON, 2008; GUNDUZ *et al*., 2009; TRIGO *et al*., 2009).

Para minimizar o risco de contaminação de vegetais frescos e para que esses não se tornem perigos à saúde do consumidor, fontes potenciais no ambiente devem ser identificadas e medidas específicas e intervenções para prevenir ou minimizar riscos devem ser consideradas e corretamente implementadas (ABADIAS *et al*., 2008a). Solo, fezes, água de irrigação, água utilizada para aplicar fungicidas, poeiras, insetos e manipulação do homem são consideradas fontes de contaminação (BEUCHAT, 2002; REINA *et al*., 2002; ISLAM *et al*., 2004; PARNELL *et al*., 2005; UKUKU e SAPERS; 2007). Com intuito de controlar a ocorrência de patógenos nesse tipo de produto, melhor atenção deve ser direcionada à adoção das boas práticas agrícolas e à análise de pontos críticos de controle (ITURRIAGA *et al*., 2007).

Na cadeia de produção de frutas e hortaliças minimamente processadas, a operação de lavagem associada ao uso de soluções sanitizantes é considerada a única etapa na qual pode ser alcançada a redução no número de micro-organismos deterioradores e patogênicos, contribuindo assim, para a segurança do produto (ARTÉS e ALLENDE, 2005; RUIZ-CRUZ *et al*., 2007; ALLENDE *et al*., 2008c).

2.2. Sanitizantes usados na indústria de processamento mínimo

A eficiência dos sanitizantes para tratamento de superfície de frutas e hortaliças pode ser limitada ou imprevisível quando grande quantidade de matéria orgânica está presente na água de lavagem (RUIZ-CRUZ *et al*., 2007). Dentre os sanitizantes empregados na indústria de alimentos, principalmente em produtos frescos, a maioria é

à base de cloro e compostos clorados (ANTONIOLLI *et al*., 2005; ALVARO *et al.*, 2009). A facilidade do uso, o baixo custo, a alta atividade antimicrobiana e completa dissolução em água, fazem com que os agentes clorados sejam frequentemente utilizados como desinfetantes na indústria de frutas e hortaliças (ALLENDE *et al.*, 2008; ANTONIOLLI *et al*., 2008; SELMA *et al*., 2008).

O cloro foi descoberto em 1808 por Humprey Davy e teve suas propriedades bactericidas demonstradas, em laboratório, por Koch, em 1881 (MACÊDO, 1997). A utilização desse agente como desinfetante foi aprovado pela Associação Americana de Saúde Pública (*American Public Health Association*-APHA) em 1886, e desde então, o cloro passou a ser utilizado no tratamento de água em todo o mundo (VEIGA, 2003; CAIXETA, 2008). A ação oxidante e sanitizante dos derivados clorados é controlada pelo ácido hipocloroso (HClO), produto resultante da hidrólise da substância clorada, que é a forma de cloro livre disponível com amplo espectro de ação contra diferentes micro-organismos (PARISH *et al*., 2003). A ação do ácido hipocloroso é dependente de pH, sendo que a concentração de HClO aumenta com decréscimo do valor de pH. A constante de dissociação (pKa) desse ácido fraco, à 30 °C, é 3,18 x 10^{-8}. Quando em solução aquosa, este ácido se dissocia para formar o íon hidrogênio e o íon hipoclorito. Assim, os compostos clorados são mais efetivos em valores de pH baixos quando a proporção de ácido hipocloroso é maior (MACÊDO *et al*., 2001).

Compostos à base de cloro atuam sobre as células microbianas na forma de ácido hipocloroso (HClO), que libera oxigênio nascente, que combina com os componentes do protoplasma celular. O próprio cloro pode combinar com proteínas de membrana celular e interferir no metabolismo microbiano (VEIGA, 2003).

As concentrações recomendadas de cloro residual livre para a sanitização de frutas e hortaliças variam de 50 a 200 mg.L^{-1} em um tempo de contato de 1 a 30

minutos (PARISH *et al*., 2003; RUIZ-CRUZ *et al*., 2007). Entretanto, em condições típicas de lavagem de frutas e hortaliças na cadeia de processamento mínimo, a eficiência do cloro em reduzir a contaminação por patógenos é limitada, alcançando a proporção de um a dois ciclos logarítmicos na população de micro-organismos (SAPERS, 2001; LEE *et al*., 2004; UKUKU, 2006; RUIZ-CRUZ *et al*., 2007; LEE e BAEK, 2008; MAHMOUND *et al*., 2008; PARK *et al*., 2009).

O uso de compostos a base de cloro requer alguns cuidados, pois se trata de substância corrosiva, que pode provocar irritações na pele e no trato respiratório (ALVARO *et al*., 2009). Deve ser considerada ainda, a possibilidade da hipercloração da água residual que, associada ao alto conteúdo de carbono orgânico, pode resultar em concentrações elevadas de trihalometanos (triclorometano, bromodiclorometano, dibromoclorometano, tribromometano e clorofórmio) e outros subprodutos da desinfecção (MARTÍN-DIANA *et al*., 2006; RUIZ-CRUZ *et al*., 2007; RICO *et al*., 2007; SELMA *et al*., 2008). A importância dos trihalometanos em nível mundial está relacionada ao fato de que, além de serem considerados carcinogênicos, são também indicadores da possível presença de outros compostos organoclorados (ácido acético clorado, haloacetonitrilos, cloropicrin, clorofenóis, cloropropanonas), também resultantes do processo de cloração das águas e mais perigosos que os próprios trihalometanos (MACÊDO *et al*., 1999). Em função disso, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classifica esses subprodutos do processo de cloração como cancerígenos e a Agência de Proteção ao Meio Ambiente (*Enviromental Protection Agency*-EPA) estabeleceu em 1998, o limite de risco médio para desenvolvimento de câncer, de 60 e 40 miligramas por litro para o clorofórmio e bromofórmio, respectivamente (MACÊDO *et al*., 1999; PAVÓN *et al*., 2008).

Neste contexto, os compostos clorados têm sido foco de preocupação ambiental e alguns grupos ambientalistas têm sugerido a extinção do uso desse produto em todo o mundo (NASCIMENTO *et al*., 2005; RICO *et al.*, 2007). Em países da Europa como Holanda, Suécia, Alemanha e Bélgica, o uso do cloro em produtos minimamente processados é proibido (RICO *et al*., 2007). Além disso, há ainda estudos sobre patógenos emergentes que seriam mais tolerantes a esses compostos clorados, o que gera dúvida quanto ao uso do cloro na indústria de minimamente processados (ALLENDE *et al.*, 2008; ALVARO *et al.*, 2009).

A sanitização é uma etapa essencial para atribuir maior segurança e extensão da vida de prateleira de produtos minimamente processados e, como futuras restrições quanto ao uso do cloro são desejáveis, há a necessidade da busca por tecnologias alternativas (RUIZ-CRUZ *et al*., 2007; ALLENDE *et al*., 2008; RICO *et al*., 2008; VANDEKINDEREN *et al*., 2008). Concomitantemente, há também a busca por técnicas de desinfecção capazes de reduzir com maior eficiência, as células microbianas na água de lavagem e nos produtos minimamente processados (ONGENG *et al*., 2006).

O Departamento de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*-FDA), órgão governamental dos Estados Unidos da América que faz o controle dos alimentos e medicamentos, propôs a avaliação de tecnologias como ozônio, dióxido de cloro, ácido peracético e peróxido de hidrogênio como alternativas para conferir maior segurança microbiológica aos alimentos (OLMEZ e KRETZSCHMAR, 2008).

Considerando a importância da etapa de sanitização para o processamento mínimo de vegetais, o estudo de processos e, ou agentes alternativos devem receber atenção especial. O uso de luz ultravioleta, irradiação, ozonização, tecnologias avançadas de oxidação (MARTÍN-DIANA *et al*., 2006; ALLENDE *et al*., 2006; SELMA *et al*., 2008), ácido peracético (ALVARO *et al*., 2009), peróxido de hidrogênio

(UKUKU, 2004; ÖLMEZ e KRETZSCHMAR, 2009), água eletrolisada (ABADIA *et al.*, 2008; RICO *et al*., 2008; ÖLMEZ e KRETZSCHMAR, 2009), ácidos orgânicos (AKBAS e OLMEZ; 2006), tratamentos com óleos essenciais (PEREIRA *et al*., 2008) e o uso do ultrassom (GUERRERO *et al*., 2001; WALKING-RIBEIRO *et al*., 2007; XU *et al*., 2007) tem sido propostos para desinfecção de alimentos.

O peróxido de hidrogênio é considerado um produto fortemente oxidante em função de sua capacidade de reduzir radicais livres que reagem com componentes celulares essenciais, incluindo proteínas, lipídeos e DNA (KITIS, 2004; RICO *et al*., 2007). De acordo com a concentração, este sanitizante pode ter efeito bacteriostático ou bactericida. Apesar de considerado eficiente, muitos fungos e bactérias podem ser resistentes de várias maneiras como pela formação de glutationa associado a enzimas e pela produção de catalase (CAIXETA, 2008). Este sanitizante é estudado como uma alternativa ao cloro na etapa de sanitização de frutas e hortaliças minimamente processadas e em geral reconhecido como seguro (GRAS) para algumas aplicações na industria de leite, ovos, chá e vinhos em processos de clarificação e também como antimicrobiano (ARTÉS e ALLENDE, 2005; OLMEZ e KRETZSCHMAR, 2008).

Dentre as características vantajosas no uso de peróxido de hidrogênio, inclui o fato de este produto gerar resíduos, sendo rapidamente decomposto pela enzima catalase em água e oxigênio, além de apresentar baixa toxicidade e não necessitar enxágue após o uso. Em contrapartida, esse sanitizante apresenta, entre as desvantagens, o poder corrosivo sobre cobre, bronze e zinco, requerer longo tempo de contato quando usado em baixas temperaturas e exigir precauções durante o manuseio e dosagem (ARTÉS e ALLENDE, 2005; CAIXETA, 2008; ARTÉS *et al*., 2009).

Em estudos têm sido avaliado o efeito do peróxido de hidrogênio como sanitizante de alimentos, incluindo frutas e hortaliças minimamente processadas

(UKUKU, 2004; UKUKU, 2006). Ukuku (2004) ao utilizar peróxido de hidrogênio a 1% no tratamento de melão minimamente processado contaminado com *Salmonella* spp. observou redução significativa na contagem deste micro-organismo, não sendo detectados sobreviventes após a etapa de sanitização. Esse autor ainda registrou a ausência do patógenos ao longo do período de armazenamento à 5 ºC.

Outro produto empregado como alternativa ao uso de composto a base de cloro na etapa de sanitização de frutas e hortaliças minimamente processadas é o ácido peracético. Este sanitizante é produzido pela reação entre ácido acético ou anidrido acético com peróxido de hidrogênio na presença de ácido sulfúrico, que tem função de catalisador da reação. É um agente oxidante forte e sanitizante, com potencial oxidativo maior que o do cloro e do dióxido de cloro. Sua atividade não é influenciada por temperatura, pH e pela presença de matéria orgânica e, assim, sendo tolerante a esses fatores, tem aplicação no processamento de vegetais (KITIS, 2004; ARTÉS *et al*., 2009). A ação desse sanitizante é fundamentada na liberação de oxigênio ativo, responsável pela oxidação de ligações sulfidrilas de proteínas, enzimas e outros metabólitos. É hipotetizado ainda a ação do ácido peracético no rompimento da função quimiostática de proteínas e lipídeos da membrana citoplasmática e do transporte, em função do deslocamento da parede celular. Em células gram-negativas, esse sanitizante também é efetivo por atuar em liproproteínas de membrana celular e no interior das células, pode promover uma desestruturação metabólica, pela oxidação de enzimas essenciais, o que corrompe vias metabólicas vitais, transporte ativo de membrana e alterar ações na concentração de solutos intracelulares (KITIS, 2004).

A redução da população microbiana por ação do ácido peracético ocorre principalmente, nos primeiros dez minutos de contato, ou seja, após esse tempo não foi verificado maior inativação. Além disso, esse sanitizante apresenta a vantagem de não

produzir subprodutos reconhecidos como tóxicos ou mutagênicos. Entretanto, é um produto que tem odor pungente e requer cuidados durante a manipulação (KITIS, 2004).

O FDA estipulou que soluções com no mínimo 85 $mg.L^{-1}$ de ácido peracético devem ser usadas na sanitização de superfícies onde os alimentos são manipulados, mas a concentração pode variar até 300 $mg.L^{-1}$ (CAIXETA, 2008; ALVARO *et al*., 2009). Este mesmo órgão regulamentador aprovou o uso de ácido peracético para a sanitização de produtos vegetais em concentrações que não ultrapassem 80 $mg.L^{-1}$ (RUÍZ-CRUZ et al., 2007).

Park e Beuchat (1999) constataram redução da população de *Salmonella* em cerca de 2,6 log $UFC.g^{-1}$ em melão e aspargos tratados com ácido peracético em concentrações de 40 ou 80 $mg.L^{-1}$. Em outro estudo, o uso de 80 $mg.L^{-1}$ de ácido peracético por 5 minutos para a sanitização de cheiro verde minimamente processado, demonstrou a possibilidade de substituir o dicloroisocianurato de sódio, devido a redução de cerca de 2 log $UFC.g^{-1}$ da população de *Escherichia coli* (SREBERNICH, 2007). RUÍZ-CRUZ et al. (2007) avaliaram o uso de ácido peracético, em cenoura minimamente processada, e observaram redução significativa na população de *Salmonella* de cerca de, 2,1 log $UFC.g^{-1}$.

Outro potente agente oxidante reconhecido como sanitizante desde 1900 é o dióxido de cloro (KIM e LINTON, 2008; MAHMOUND e LINTON, 2008). Esse composto pode ser produzido por meio de duas reações: reação de um ácido com cloreto de sódio ou a reação do cloreto de sódio com gás cloro. Há indícios de que sua capacidade oxidante seja 2,5 vezes maior que a do cloro e menos reativo com matéria orgânica (SY et al., 2005; WU e KIM, 2007; LÓPEZ-GÓMEZ *et al*., 2009a). Assim, apesar de ser um composto clorado, não produz quantidades significativas de trihalometanos, não sendo de risco ambiental e nem para a saúde. Diferente do cloro, a

atividade antimicrobiana do dióxido de cloro é independente do valor de pH da solução sanitizante (ÖLMEZ e KRETZSCHNAR, 2008).

A ação do dióxido de cloro é fundamentada na reação de oxidação de proteínas da membrana celular, incluindo aquelas envolvidas no transporte de solutos. Pela facilidade de penetração na membrana celular de bactérias, provoca alterações transmembranas dos gradientes iônicos e inibe a respiração celular. Atua ainda na oxidação de grupos sulfidrilas (-SH) em enzimas com formação de dissulfito (-S-S-), que são análogos sem função (VANDEKINDEREN *et al*., 2009).

Apesar da estabilidade do dióxido de cloro ser superior a do cloro, esse sanitizante apresenta instabilidade durante a produção e estocagem, portando é necessário o seu preparo imediatamente antes do uso (KIM *et al*., 2008; LÓPEZ-GÓMEZ *et al*., 2009). A forma aquosa do dióxido de cloro é amplamente utilizada pela indústria de alimentos e pode ser usada como sanitizante para superfícies de alimentos e superfícies que entram em contato com alimentos (ÖLMEZ e KRETZSCHNAR, 2008; LÓPEZ-GÓMEZ *et al*., 2009). O FDA aprovou o uso desse produto no controle de micro-organismos em água de *chiller* para processamento de carnes de aves, para sanitização de vegetais e para carnes (SINGH *et al*., 2003; KIM e LINTON, 2008).

Na literatura, há diversos registros de avaliação desse sanitizante em produtos minimamente processados. Morangos sanitizados com 5 $mg.L^{-1}$ de gás dióxido de cloro por 10 minutos, apresentaram redução de quatro ciclos logarítmicos comparada a contagem inicial de mesófilos e, ao longo do armazenamento, a população manteve-se em números não detectáveis até o 12º dia (MAHMOUND *et al*., 2007). Srebernich (2007) usou solução de dióxido de cloro 50 $mg.L^{-1}$, por 10 minutos em cheiro verde e observou redução de três ciclos logarítmicos na população de coliformes totais, e

concluiu que esse sanitizante pode ser uma alternativa a sanitizantes como o hipoclorito de sódio.

Embora diferentes sanitizantes sejam usados no controle microbiológico de frutas e hortaliças minimamente processadas, sobrevivência de micro-organismos deterioradores e patogênicos irá influenciar diretamente a conservação, a qualidade e a segurança do produto final.

2.3. Utilização do ultrassom como alternativa na etapa de sanitização

O ultrassom é uma tecnologia adotada na indústria de eletrônicos como descontaminante de superfícies e seu uso tem sido recomendado na indústria de alimentos (LEE *et al*., 2003; NASCIMENTO *et al*., 2008). Essa tecnologia tem uma gama extensiva de aplicações na indústria de alimentos como aferição de textura, de viscosidade, de concentrações de alimentos sólidos e fluidos e inativação de enzimas (LEE *et al*., 2003; VALERO *et al*., 2007). Floros e Liang (1994) mencionaram ainda a utilização do ultrassom em limpeza de superfícies, drenagem, processos de extração, filtração e inativação de micro-organismos.

No processamento de alimentos, o ultrassom de alta intensidade em baixas freqüências de 20 a 100 kHz tem utilidade na inativação de micro-organismos (PIYASENA *et al*., 2003). Essa inativação é conseqüência de um processo denominado cavitação, que consiste de formação, crescimento e colapso de bolhas, que geram uma energia mecânica e química localizada (GOGATE e KABADI, 2009). A cavitação quando ocorre em um reator, gera condições localizadas de altas temperaturas e pressões denominadas de *hot spots*, além de liberar radicais livres que são gerados em função da dissociação de vapores presos nas bolhas. A cavitação também gera

turbulência localizada e microcirculação de líquidos. Todas essas alterações promovidas pela cavitação contribuem para ação de limpeza sobre as superfícies (PIYASENA *et al.*, 2003; GOGATE e KABADI, 2009). O processo de cavitação está apresentado na Figura 1.

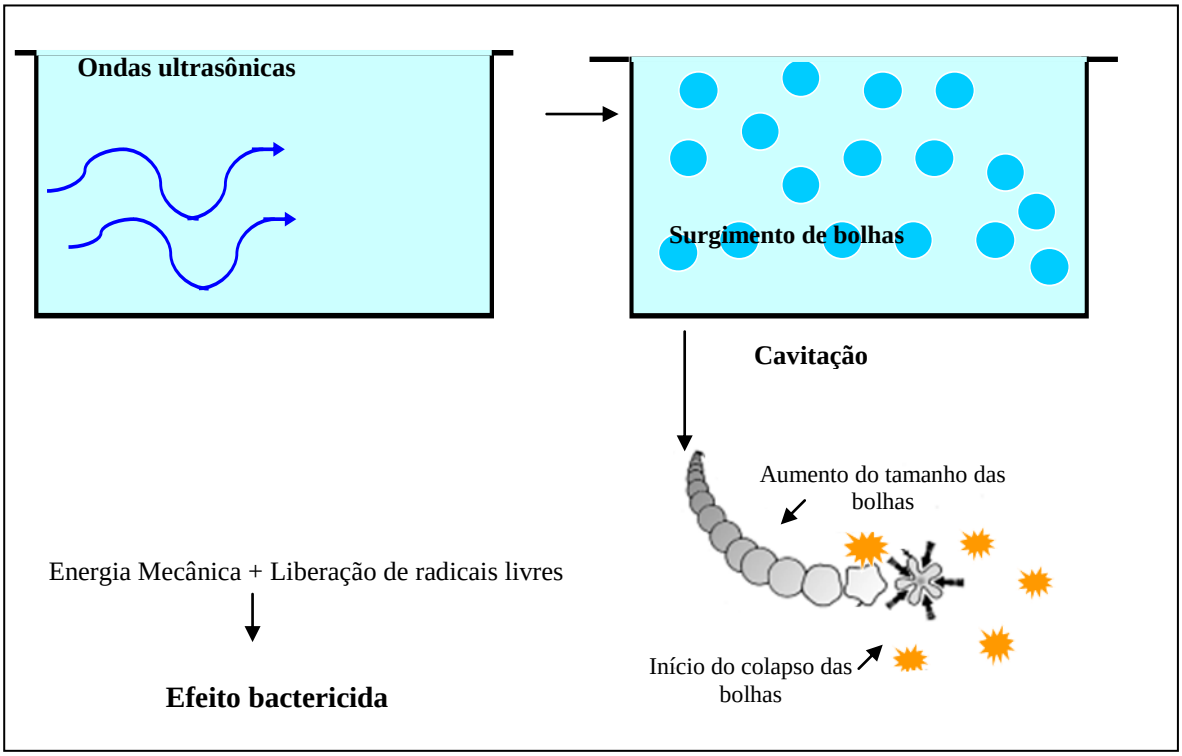

Figura 1 – Ondas ultrasônicas e o processo de cavitação.

Quando o ultrassom é empregado associado com agentes químicos como Cl_2, H_20_2, O_3, o intenso gradiente de pressão permite a penetração desses agentes oxidantes pela da membrana celular dos micro-organismos. Além disso, a cavitação pode facilitar a desagregação de micro-organismos presentes e assim, aumentar a eficiência dos sanitizantes químicos (GUERRERO *et al.*, 2001; GIL *et al.*, 2009; GOGATE e KABADI, 2009).

O fato da utilização do ultrassom não gerar odores desagradáveis e a perda de nutrientes (LEE *et al.*, 2003; PIYASENA *et al.*, 2003), somado ao fato da possibilidade

de ser aplicado à temperatura ambiente, sem geração de calor (FERNANDES e RODRIGUES, 2007), torna esse processo aplicável ao processamento mínimo de frutas e hortaliças.

O efeito do ultrassom sobre micro-organismos pode ser ilustrado pelos resultados de Munkasci e Elhami (1976), que observaram a inativação de 93% dos coliformes presentes em amostras de leite integral tratadas com ultrassom. Em meio de cultura líquido, Villamiel *et al*. (1999) observaram a redução de 2,5 log.UFC de *Salmonella* após 10 minutos de tratamento com ultrassom.

Apesar de grande parte dos estudos com ultrassom serem realizados em sistemas líquidos (SAN MARTÍN *et al*., 2001; GUERRERO *et al*., 2001; ZENKER *et al*., 2003), sabe-se que micro-organismos contaminantes em alimentos sólidos também podem ser inativados por essas ondas (MASON *et al*., 2005). Ao utilizar o ultrassom durante 30 minutos, Bermúdez-Aguirre e Barbosa-Cánovas (2008) observaram redução de 2,5 log UFC.g^{-1} de *L. innocua* ATCC 51742 em leite integral. Esses autores obtiveram redução de 4,9 log UFC. g^{-1} em amostras de leite desnatado, o que indicou que os glóbulos de gordura poderiam ter exercido u efeito protetor sobre as células microbianas. Oulahal *et al*. (2007) observaram a remoção de 49,5 e 39,5 % de biofilmes de *E. coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, em superfícies contendo carne pela ação de ultrassom (40 kHz).

A associação do ultrassom com outros métodos de sanitização resultaram em maior eficiência do processo. O tratamento com ultrassom, na frequência de 20 kHz, não reduziu efetivamente a população de *L. monocytogenes*, que apresentou tempo de redução decimal (valor D) de 4,3 minutos (PAGAN *et al*., 1999). Porém, esses últimos autores, combinaram o tratamento do ultrassom com o aumento de pressão (200 kPa) e observaram redução do valor D para um minuto.

Seymour *et al*. (2002) registraram que a associação do ultrassom com hipoclorito de sódio a 50 $mg.L^{-1}$ resultou na redução de 1,2 log $UFC.g^{-1}$ a mais de células de *Salmonella* Typhimurium em alface comparação ao efeito produzido por tratamento com a solução clorada. Scouten e Beuchat (2002) constataram que a combinação do ultrassom e $Ca(OH)_2$ pode ser uma alternativa para a descontaminação de brotos de alfafa inoculados com *Salmonella* e *E. coli* 0157:H7. Maçãs tratadas com ultrassom com frequência igual 170 kHz combinado ao dióxido de cloro 20 $mg.L^{-1}$ tiveram a população de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 reduzidas em torno de 4 log $UFC.g^{-1}$ (HUANG *et al*., 2006). Esses resultados indicaram que o ultrassom associado a outros sanitizantes tem capacidade de potencializar a redução da microbiota presente no produto.

2.4. Ocorrência de patógenos em hortaliças e frutas minimamente processadas

Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Aeromonas* e o vírus da Hepatite A, são alguns dos micro-organismos associados a surtos causados pela ingestão de alimentos (Quadro 1), como frutas e hortaliças contaminados, e indicam a importância do controle destes patógenos para a saúde pública (LAPIDOT *et al*., 2006; SILVA *et al*., 2006; ABADIAS *et al*., 2008a).

Embora qualquer patógeno possa tornar-se um problema potencial em frutas e hortaliças, *Salmonella* spp. apresenta relevância especial para a saúde pública (BUCK *et al*., 2003; ELIZAQUÍVEL e AZNAR, 2008). Nos Estados Unidos estima-se que ocorram 1,4 milhões de casos de salmonelose anualmente, sendo 40.000 são confirmados laboratorialmente aproximadamente mais de quinhentos casos são fatais e 2% apresentam artrite crônica como complicação (CDC, 2001).

Quadro 1. Ocorrência de micro-organismos patogênicos em hortaliças e frutas inteiras frescas e, ou minimamente processadas.

Microrganismo	Produto	País	Referência
Aeromonas spp.	Alface fatiado	Austrália	Szabo et al (2000).
	Hortaliças orgânicas	Irlanda do Norte	McMahon e Wilson (2001).
Escherichia coli 0157:H7	Salsa	Estados Unidos e	Naimi et al. (2003).
	Espinafre	Canadá Estados Unidos	FDA (2006a); CDC (2006).
Salmonella spp.	Tomate	Estados Unidos	CDC (2007); CDC (2008).
	Salsa Alface	Estados Unidos Zâmbia	CDC (2000). Nguz et al. (2005).
Listeria monocytogenes	Fruta *Krisp Pack* (fruta minimamente processada)	Estados Unidos	FDA (2006b).
Vírus da Hepatite A	Morango	Austrália Irlanda do Norte	Behrsing et al. (2003). Flessa et al. (2005).

Salmonella é um gênero da família Enterobacteriacea, definido como pequenos bastonetes gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. Espécies desse gênero podem crescer a temperaturas de 5 a 46 ºC, sendo a

temperatura ótima entre 35 ºC e 43 ºC. O pH para crescimento varia entre 3,8 e 9,5, com ótimo entre 7,0 e 7,5 (JAY, 2005). É uma bactéria distribuída na natureza, responsável por graves infecções alimentares, sendo o homem e os animais domésticos como principais reservatórios. A maioria dos sorotipos desse gênero é patogênica ao homem e apresenta diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (JAY, 2005; SHINOHARA *et al*., 2008). Entre os sorotipos mais frequentemente isolados em episódios de infecção alimentar em humanos, encontram-se *Salmonella enterica* sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Bredeney e Tenessee (STEPANOVIC *et al*., 2003; SILVA *et al*., 2005).

A dose infectante depende do sorotipo e oscila entre 2,0 x 10^2 a 1,0 x 10^6 UFC e há variação quanto ao alimento envolvido e a espécie de *Salmonella* em estudo. Espécies adaptadas ao homem atuam em doses infectantes menores comparadas as estirpes não adaptadas para provocar a mesma sintomatologia característica da doença. (LIMA, 2008; SHINOHARA *et al*., 2008;). Mesmo fora do hospedeiro animal, esse patógeno pode sobreviver por longos períodos (FRANZ *et al*., 2007).

A salmonelose é contraída principalmente por meio do consumo de alimentos de origem animal, como carne bovina, carne de aves e ovos contaminados. A ocorrência de *Salmonella* spp. em frutas e hortaliças é baixa quando comparada à outros tipos de alimentos. Entretanto, há registros de surtos de infecção alimentar causados por diferentes sorotipos de *Salmonella* devido ao consumo de hortaliças como repolho, alface, salsa, pimentão, espinafre (HEDBERG *et al*., 1999), tomate (CDC, 2007), morango (CDC, 1991; CDC, 2002), e frutas como maçã, melão (CDC, 1991; CDC, 2002), melancia e manga (ISLAM *et al*., 2004; ANNOUS *et al*., 2005; BORDINI *et al*., 2007).

Tomates frescos foram associados à ocorrência de samonelose nos Estados Unidos, com registros de surtos nos anos de 1990, 1993, 1998, 2002 e 2004. Entre os anos de 2005 e 2006, quatro surtos de infecção por *Salmonella* foram associados novamente ao consumo de tomate nesse mesmo país (CDC, 2007). Em 2008, outro surto foi associado ao consumo de tomates contaminados por *Salmonella* Saintpaul e atingiu 167 pessoas em 17 estados americanos (CDC, 2009).

Salmonella pode ser veiculada para frutas e hortaliças minimamente processadas nas etapas de pré-colheita e na pós-colheita (KROUPITKSI *et al*., 2009). A capacidade de patógenos sobreviverem e crescerem durante a produção é influenciada por sua adaptação a ambientes diferentes fora do hospedeiro (BEUCHAT, 2002). Entretanto, adesão e persistência do patógeno em produtos frescos e produtos minimamente processados são fatores importantes e que contribuem para a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar (KROUPITKSI *et al*., 2009).

Os micro-organismos apresentam caráter anfipático, ou seja, podem apresentar características hidrofóbicas e hidrofílicas. Essa variação é decorrente da interação dos grupos apolares e polares presentes na parede microbiana (BOTERO *et al*., 2008). A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são forças físico-químicas envolvidas na aderência de microrganismos às superfícies sólidas. As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos micro-organismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas do que às hidrofílicas. Estudos mostram que a adesão microbiana se torna melhor com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão (RODRIGUES *et al*., 2009). Acredita-se que interações hidrofóbicas apresentam papel relevante na adesão de microrganismos, tanto em superfícies inertes para processamento de alimentos, quanto em superfícies de alimentos, como a carne (FIGUEIREDO, 2000).

Apesar da adesão bacteriana às superfícies de vegetais ser limitada comparada à superfícies de outros produtos, a exemplo de carnes, a adesão e posterior infiltração pode ocorrer sendo em geral facilitada pela presença do estômato, lenticelas, tricomas rompidos e pequenas ranhuras na superfície (BURNETT e BEUCHAT, 2001; SOLOM e MATTHEWS, 2006; VELÁZQUEZ *et al*., 2009). Embora as cutículas de plantas contenham ceras que dificultam a adesão dos micro-organismos ao tecido vegetal e protegem de estresses ambientais, alguns patógenos em vegetais e em humanos podem romper essa barreira (ARUSCAVAGE *et al*., 2006). Alguns patógenos têm a capacidade de infiltrar no tecido vegetal, e assim, são protegidos da ação de sanitizantes químicos e físicos, ou outro método de limpeza e sanitização (HAN *et al*., 2000; ANNOUS *et al*., 2005). Há uma indicação de que a infiltração de patógenos no tecido de frutas e hortaliças ocorra durante o contato da superfície do produto com células presentes na água ou no solo (BURNETT *et al*., 2000; FRANZ *et al*., 2007).

A adesão microbiana é um processo associado à ocorrência de diferentes doenças humanas e animais, na formação de placas dentárias e em processos industriais como em superfícies de equipamentos, tubulações e bancadas. A interação ocorre sempre entre micro-organismos e superfícies, seja ela de matéria inerte ou biológico (ITURRIAGA *et al*., 2007; LIMA, 2008).

Os micro-organismos têm a oportunidade de aderir e nesta condição tornam-se mais resistentes a alterações ambientais. O biofilme constitui-se de um arranjo de células microbianas que se associa de forma irreversível a uma determinada superfície com produção de matriz exopolissacarídica (ARUSCAVAGE *et al*., 2006; ITURRIAGA *et al*., 2007). A produção dessa matriz confere maior capacidade de resistência à desinfecção ou à sanitização comparada às células em suspensão (RAYNER *et al*., 2004; BASTOS *et al*., 2005).

A principal peculiaridade associada à adaptação de patógenos em produtos vegetais é o desenvolvimento de biofilmes (KROUPITKSI *et al*., 2009). A formação de biofilmes na superfície de vegetais folhosos, como espinafre, alface, repolho, aipo, alho-poró, manjericão e salsa tem sido demonstrada foi demonstrada por Beuchat (2001) e Lapidot (2006).

Patógenos incorporados nesses biofilmes podem ser protegidos da etapa de lavagem e servir como possível troca de elementos genéticos de resistência. Regiões cortadas e, ou danificadas de superfícies são sítios potenciais para a formação de biofilmes, o que contribui para a redução da efetividade dos sanitizantes, já que bactérias aglomeradas em biofilmes são menos influenciadas pelas soluções do que as células livres (ARUSCAVAGE *et al*., 2006). Assim, há interesse em utilizar mecanismos que promovam a desestabilização dessa estrutura e que permitam o acesso dos sanitizantes aos micro-organismos.

Estudos demonstraram a capacidade de patógenos, como *Salmonella* em aderir, produzir matriz exopolissacarídica e formar biofilmes em superfícies inertes (JOSEPH *et al*., 2001; STEPANOVIC *et al*., 2004; OLIVEIRA, 2006; CHIA *et al*., 2009).

O mecanismo molecular envolvido na adesão e na formação de biofilme por *Salmonella* ainda não é completamente entendido, sabe-se apenas que o promotor *agfD* está envolvido na formação dessa estrutura. A expressão de genes é regulada em resposta a diferentes sinais do ambiente como temperatura, osmolaridade, presença de oxigênio, presença de gás carbônico, variações no valor de pH, presença de compostos nitrogenados, disponibilidade de nutrientes e concentração de íons orgânicos e inorgânicos (STEPANOVIC *et al*., 2003).

Iturriaga *et al*. (2003) demonstraram que *Salmonella* Montevideo é capaz de aderir à superfícies de tomates. Já Ukuku e Sapers (2001) verificaram que *Salmonella* e

outros patógenos têm capacidade de aderir-se à superfícies externas de melão e tornarem problemas de saúde pública, pois durante o corte, há possibilidade de transferência do patógeno para a polpa. A formação de biofilmes por *Salmonella* spp. em melão e sua resistência à soluções sanitizantes foi observada por Annous *et al*. (2005).

Brandl e Mandrell (2002) e Cooley *et al*. (2003) demonstraram a formação de agregados de *Salmonella* spp. em coentro e em plantas do gênero *Arabidopsis*. A capacidade de *Salmonella* Typhimurium aderir à superfície de vegetal folhoso, a exemplo da salsa, foi demonstrada por Lapidot *et al*. (2006).

Desde que a contaminação dos produtos frescos com micro-organismos patogênicos possa ocorrer em qualquer ponto do plantio até o consumo, a possibilidade de aderência da bactéria patogênica e posterior formação do biofilme, indicam a necessidade de aplicar medidas de controle para garantir a qualidade microbiológica do produto.

Considerando que a completa remoção e, ou a eliminação de *Salmonella*, ou outros patógenos de superfícies de produtos frescos, estes fatores são considerados desafios. Portanto torna-se importante o estudo e desenvolvimento de novas estratégias que busquem contribuir para segurança microbiológica do produto que é disponibilizada ao consumidor.

O uso do ultrassom é indicado com objetivo de desagregar biofilmes ou até mesmo, inativar micro-organismos, o que pode contribuir no processamento de muitos produtos, inclusive os produtos minimamente processados, atendendo, assim, às novas tendências de mercado. Torna-se, portanto, importante avaliar a eficiência da aplicação isolada e em associação a sanitizantes para reduzir a contaminação de alimentos minimamente processados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

3.1. Preparo da matéria-prima e sanitização das hortaliças minimamente processadas

As hortaliças agrião salsa, morango e tomate cereja foram adquiridas em comércio varejista local e armazenados em suas embalagens originais, sob refrigeração, a 7 ºC, por no máximo, 24 horas, até o processamento.

As hortaliças foram selecionadas, descartando-se aquelas com má formação, danificadas e, ou apodrecidas. No caso de hortaliças folhosas, as folhas que apresentavam coloração amarelada e os talos foram removidos. Em seguida, foram lavadas com água corrente para remoção das sujidades aderidas à superfície e então drenados por 15 minutos.

A etapa de sanitização consistiu na imersão das hortaliças em 300 mL de solução sanitizante, por 10 minutos à temperatura de 20 ºC, sendo usadas 60 g de agrião, 35 g de salsa, 100 g de morango e de tomate cereja.

Foram avaliados os efeitos dos agentes sanitizantes: dicloroisocianurato de sódio, dióxido de cloro, ácido peracético e peróxido de hidrogênio associados ou não com o ultrassom de baixa freqüência de 45 KHz (Ultrasonic Cleaner Model 08849-00, Cole Parmer®) (Quadro 2). Como controles, foram adotados o tratamento com água destilada esterilizada e o tratamento no qual as hortaliças não foram submetidos à sanitização.

Quadro 2 – Caracterização dos sanitizantes empregados.

Componente ativo	**Concentração utilizada**	**pH**	**Nome comercial**	**Concentração do componente ativo no produto comercial**
Dicloroisocianurato de sódio	50 e 200 $mg.L^{-1}$	6,5	Sumaveg ®	300.000 $mg.Kg^{-1}$
Peróxido de hidrogênio	5%	4,5	Perhydrol®	30%
Ácido peracético	40 $mg.L^{-1}$	2,5	Proxitane®	150.000 $mg.L^{-1}$
Dióxido de cloro	10 $mg.L^{-1}$	9,2	Veromax 80®	80.000 mg.L

Imediatamente após cada tratamento de sanitização, foi realizada a observação da alteração em algumas características do produto, como odor e coloração.

3.2. Análise de pH

A determinação do valor de pH de cada produto minimamente processado foi determinado em potenciômetro digital (Tradelab®). Para medir o pH do morango e do tomate cereja foram utilizadas 20 g de cada produto e, no caso da salsa e do agrião, utilizou-se 5 g.

As amostras foram maceradas individualmente em gral de porcelana, obtendo-se um homogenato, o qual foi diluído em igual volume de água destilada.

3.3. Análises microbiológicas das hortaliças minimamente processadas

As análises microbiológicas foram feitas por meio da contagem padrão de mesófilos aeróbios e de fungos filamentosos e leveduras (BRASIL, 2003).

Para as análises de tomates cereja e de morangos foram coletadas, assepticamente, amostras de 25 g de cada produto que foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1%. Por se tratarem de amostras volumosas, o agrião e a salsa foram analisados em porções de 20 g e 10 g, respectivamente. A homogeneização foi feita em s*tomacher* (Sweard Medical Co., Londres, Reino Unido), por um minuto, em velocidade normal. Diluições decimais apropriadas foram preparadas e alíquotas dessas diluições foram transferidas para meios de cultura específicos para a determinação de cada grupo microbiano.

3.3.1. Contagem padrão de mesófilos aeróbios

Utilizou-se a técnica de plaqueamento em profundidade ou *pour plate*, inoculando-se uma alíquota de 1 mL de diluições apropriadas, em duplicata, em placas de Petri utilizando ágar para contagem padrão (PCA) (Difco®). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 35 ± 2 ºC, por 48 horas. Para a contagem das colônias foram selecionadas placas contendo entre 25 e 250 colônias, e em seguida, foi calculado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama do produto analisado.

3.3.2. Contagem padrão de fungos filamentosos e leveduras

A contagem padrão de fungos filamentosos e leveduras foi feita pela técnica de espalhamento em superfície, inoculando-se uma alíquota de 0,1 mL das diluições apropriadas em ágar Batata Dextrose (BDA) (Oxoid®), acidificado com solução de ácido tartárico 10%, esterilizada, para alcançar o pH 3,5. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 25 ± 2 ºC, por 5 a 7 dias. Foram selecionadas placas contendo entre 15 e 150 colônias para contagem. O resultado foi expresso em número de UFC por grama do produto analisado.

3.4. Contagem de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja

3.4.1. Preparo do tomate cereja

Inicialmente, os tomates cereja foram selecionados, optando-se por aqueles com textura firme e isentos de fissuras ou rachaduras na superfície. Em seguida, os tomates foram limpos e lavados criteriosamente em água destilada esterilizada, dispostos em placas de Petri e submetidos à luz ultravioleta (254 nm), a 38 cm de distância, por 15 minutos, para redução da microbiota contaminante natural do tomate.

3.4.2. Contaminação intencional dos tomates cereja

Células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foram cultivadas em 200 mL de caldo Luria Bertani (LB), à 37 ºC, por 16 horas até atingir a população de 10^6 e 10^7

UFC L^{-1}. Foram colocados 10 tomates em sacos plásticos esterilizados e, em seguida, foi adicionado 150 mL da cultura de *Salmonella* 10^6 UFC. mL^{-1}.

A incubação foi feita por 48 horas e, após este período, foi feita a remoção dos tomates auxílio de pinça esterilizada. Posteriormente, os tomates foram submetidos aos tratamentos de sanitização por imersão em 300 mL de solução de dicloroisocianurato de sódio a 200 mg. L^{-1}, de ácido peracético a 40 mg. L^{-1}, em ultrassom (45 KHz) e ultrassom combinado a de ácido peracético a 40 mg. L^{-1}. Como controles, foram utilizados tomates cerejas não sanitizados e lavados em água destilada. Os tratamentos foram realizados por 10 minutos, exceto o tratamento com ultrassom que foi avaliado também por 20 e 30 minutos. A quantidade de tomate cereja submetido aos tratamentos foi de 50 g.

3.4.3. Quantificação de células aderidas

Células aderidas, tomates cereja foram retirados da suspensão de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 nos diferentes tempos de amostragem e lavados em solução salina peptona 0,1% esterilizada para retirada das células não aderidas. Em seguida, foram submetidos aos diferentes tratamentos de sanitização descritos no item anterior.

Após cada tratamento, os tomates foram transferidos para sacos plásticos esterilizados, contendo solução salina peptonada a 0,1% esterilizada e então, homogeneizados em s*tomacher* por dois minutos em velocidade normal. Em seguida, uma alíquota foi retirada para preparar as diluições decimais a serem plaqueadas pela técnica de espalhamento em superfície em ágar *Salmonella Shigella* (SSA). Após a incubação por 18 a 24 horas, a 37 ºC foi feita a contagem das colônias.

3.5. Observações microscópicas de células de *Salmonella* aderidas à superfície de tomate cereja

3.5.1. Preparo de cortes de tomate cereja

Inicialmente, os tomates cereja foram limpos e lavados em água destilada esterilizada. Em seguida, foi retirada assepticamente a camada mais externa do tomate e feitos cortes de 1,0 cm x 1,0 cm com auxílio de um bisturi esterilizado. Os cortes foram dispostos em placas de Petri contendo água esterilizada e submetidos à luz ultravioleta com comprimento de 254 nm, a 38 cm de distância, por 15 minutos de cada lado, para redução da microbiota contaminante natural do tomate.

Avaliação preliminar mostrou que o tratamento com radiação ultravioleta reduziu, em média, um ciclo logarítmico de contaminantes do tomate cereja.

3.5.2. Preparo do inóculo

Células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foram cultivadas em 50 mL de caldo LB, à 37 ºC, por 16 horas. Após essa etapa, o caldo LB contendo 10^6 UFC. mL^{-1} foi distribuído em placas de Petri com 13,5 cm de diâmetro. Em seguida, foram dispostos 25 cortes de tomate por placa.

A incubação foi feita por 24, 48, 72 e 96 horas e a cada 24 horas, cinco cortes foram removidos com pinça esterilizada. Posteriormente, os cortes foram submetidos aos tratamentos de sanitização por imersão em solução de dicloroisocianurato de sódio 200 mg. L^{-1}, solução de ácido peracético 40 mg.L^{-1}, em ultrassom (45 KHz) e ultrassom combinado com solução de ácido peracético 40 mg. L^{-1}. Como controles, utilizaram-se

cortes não sanitizados e lavados em água destilada. Os tratamentos foram realizados durante 10 minutos, exceto o tratamento com ultrassom que foi avaliado também nos tempos de 20 e 30 minutos. O volume da solução sanitizante empregado foi 200 mL.

Após cada tratamento de sanitização, os cortes foram submetidos às etapas de preparação para observação microscópica.

3.5.3. Microscopia de epifluorescência

Após a sanitização, os cortes de tomate cereja foram enxaguados com 5 mL de tampão PBS 0,05 mol L^{-1}, pH 6,8 a 7,2, para remoção de resíduos dos sanitizantes e células não aderidas. Os cortes foram corados com laranja de acridina 0,01% por três minutos e, posteriormente, foram imersos uma vez em água destilada esterilizada para remoção do excesso de corante (MORRIS, 1997). Em seguida, cada corte foi disposto sobre lâminas de vidro e coberto com lamínula e foram observados em microscópio de epifluorescência, modelo PX60 (Olympus, Japão), em aumento de 1.000 vezes, utilizando-se o filtro azul (WU) e sistema de registro de imagens.

Foi feita a observação de, pelo menos, quinze campos de 0,038 mm^2 em cada corte, com objetivo de verificar a uniformidade de adesão na superfície e de áreas de adesão das imagens obtidas.

3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura

Os cortes de tomate para observação em microscópio eletrônico de varredura foram sanitizados como descrito no item 3.5.2. e enxaguados em tampão PBS 0,05 mol L^{-1}, pH 6,8 a 7,2, para remoção dos resíduos dos sanitizantes e células não aderidas. A

etapa de fixação consistiu do tratamento com glutaraldeído a 5 % e tampão PBS 0,1 mol.L^{-1}, na proporção de 1:1 por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas seis lavagens, de 10 minutos cada, em tampão PBS a 0,05 mol.L^{-1}, pH 6,8 a 7,2. A etapa da desidratação consistiu de tratamentos seriados em etanol, nas graduações de 30 º, 50 º, 70 º, 80 º, 95 º Gay Lussak (GL), por 10 minutos cada e três tratamentos de 15 min, em etanol 100 º GL. Os cupons foram transferidos para o secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer – modelo CPD020, Balzers, Liechstenstein) para a desidratação total. Por último, foram metalizados em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechstenstein) para posterior observação ao microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP Zeiss, Cambridge, Inglaterra) e registro das imagens.

3.6. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo 11 tratamentos (dicloroisocianurato de sódio a 50 mg.L^{-1}, dicloroisocianurato de sódio a 200 mg.L^{-1}, peróxido de hidrogênio a 5%, ácido peracético a 40 mg.L^{-1} , dióxido de cloro a 10 mg.L^{-1} e ultrassom a 45 kHz, e ultrassom associado a cada um dos sanitizantes) mais o tratamento controle (não sanitizado), sendo realizado para cada tratamento quatro repetições. A unidade experimental submetida a cada tratamento consistiu de 60 g de agrião, 30 g de salsa, 100 g de tomate cereja e de morango.

A avaliação do efeito da sanitização do tomate cereja contaminado com *S.* Typhimurium ATCC 14028 foi analisado segundo delineamento inteiramente casualizado, sendo seis tratamentos (não sanitizado, dicloroisocianurato de sódio a 200 mg.L^{-1}, ácido peracético a 40 mg.L^{-1}, tratamento com ultrassom por 10, 20 e 30 minutos

e ultrassom 45 kHz combinado ao ácido peracético a 40 mg.L^{-1}).

Os dados foram analisados com auxilio do *software* SAS, versão 9.1 (Statistical Analysis – SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos logaritmos do número de unidades formadoras de colônia por grama (log UFC.g^{-1}) dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Alterações de pH e de características sensoriais em hortaliças após tratamentos de sanitização

O pH das hortaliças usadas no presente estudo foi medido antes e após a sanitização com dicloroisocianurato de sódio a 200 $mg.L^{-1}$, peróxido de hidrogênio a 5%, ácido peracético a 40 $mg.L^{-1}$, dióxido de cloro a 10 $mg.L^{-1}$ e ultrassom 45 kHz. Alguns dos sanitizantes usados promoveram alterações no valor de pH das hortaliças (Tabela 1).

Dentre os sanitizantes, a solução de ácido peracético a 40 $mg.L^{-1}$ foi o que provocou maior redução no valor de pH dos vegetais. A influência dos sanitizantes no pH dos vegetais é um fator importante a ser observado, já que durante o período de estocagem esses valores tendem a alterar, o que pode contribuir para a aceleração da deterioração do produto (RICO *et al*., 2007).

As soluções dos diferentes sanitizantes, nas concentrações adotadas, não implicaram em alterações da coloração de tomate cereja, agrião e salsa minimamente processados, sendo este resultado importante considerando que consumidores têm a aparência e coloração do produto como primeiro critério para a compra (KAYS, 1999; ARTÉS *et al*., 2006; RICO *et al*., 2007). Entretanto, os tratamentos com soluções de

peróxido de hidrogênio e ácido peracético, associados ou não ao ultrassom, alteraram a coloração dos morangos minimamente processados. Pode ser observado esbranquiçamento dos morangos tratados estas soluções. Muitos sanitizantes possuem propriedades oxidantes que causam efeitos deletérios na coloração, de forma a induzir escurecimento ou esbranquiçamento do tecido vegetal (ARTÉS *et al*., 2008). Estudos revelaram que peróxido de hidrogênio induz o escurecimento de produtos como alface e cogumelos (SAPERS *et al*., 2000; McWATTERS *et al*., 2002). Entretanto, o escurecimento das hortaliças folhosas usadas no presente trabalho não foi constatado.

Tabela 1 - Valores de pH das hortaliças minimamente processadas

Hortaliças	**pH**					
	Antes da sanitização	**Após a sanitização com as soluções sanitizantes**				
		Dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L^{-1}	**Peróxido de hidrogênio 5%**	**Ácido peracético 40 mg.L^{-1}**	**Dióxido de cloro 10 mg.L^{-1}**	**Ultrassom 45 kHz**
Agrião	6,62 ^{a} ± 0,08	6,26 ^{b}± 0,06	6,38 ^{b} ± 0,38	5,60 ^{c} ± 0,08	6,66 ^{a} ± 0,12	6,25^{b} ± 0,36
Salsa	6,22^{a} ± 0,04	5,82^{b} ± 0,03	5,84^{b} ± 0,08	5,48^{b} ± 0,25	6,13^{a} ± 0,18	6,04^{a} ± 0,04
Morango	3,07^{a} ± 0,02	3,17^{a} ± 0,21	3,15^{a} ± 0,04	2,86^{b} ± 0,03	3,89^{a} ± 0,13	3,08^{a} ± 0,14
Tomate	4,03 ^{a} ± 0,38	3,92 ^{a} ± 0,15	4,03 ^{a} ± 0,21	3,80 ^{a} ± 0,18	4,15 ^{a} ± 0,12	4,05 ^{a} ± 0,20

*Médias seguidas da mesma letra e na mesma linha não diferiram entre si, considerando p<0,05.

A solução de ácido peracético com valor baixo de pH, igual a 2,5, o tratamento de sanitização não causou danos aparentes na textura das hortaliças. Juntamente com a coloração do produto, a textura é outra característica que demonstra o frescor da maioria dos vegetais (RICO *et al*., 2007). Vandekinderen *et al*. (2008) observaram alteração na textura de cenouras após o uso de ácido peracético a 250 mg.L^{-1}. Fantuzzi *et al*. (2004)

não observaram alteração aparente na textura de repolho minimamente processado após sanitização com ácido acético 1% e pH igual a 2,6.

O tratamento com ultrassom não alterou coloração e textura das hortaliças, resultado que diferiu do observado por Seymour *et al*. (2002) que detectaram, após 150 segundos de tratamento com ultrassom 32 a 40 kHz, o aparecimento de pequenas manchas em morango e em hortelã e o escurecimento das extremidades em salsa.

No presente trabalho, o corte e, ou remoção de estruturas dos vegetais não consistiu de etapas que promovessem grandes alterações fisiológicas. Por exemplo, no morango, houve apenas remoção do pedúnculo e das sépalas, o que não provoca um incremento na taxa respiratória do produto e nem na produção de etileno (ARTÉS *et al*., 2006). Entretanto, deve-se considerar que a perda da firmeza pode ser acelerada pelas condições de processamento (PINTO, 2007).

A alteração de odor das hortaliças após a sanitização só foi percebida com o uso do ácido peracético para todas as hortaliças estudadas. Deve-se considerar que estes produtos não foram submetidos à etapa de enxágue. Este resultado difere do observado por Vandekinderen *et al*. (2008), que não detectaram alteração de atributos sensoriais como sabor, qualidade visual e odor em repolho, alface e alho poró tratados com o mesmo sanitizante na concentração igual a 250 $mg.L^{-1}$.

No presente trabalho não foi percebida alteração de odor nas hortaliças tratadas com dicloroisocianurato de sódio. O ultrassom também não provocou alterações no odor dos vegetais, corroborando com indicações descritas na literatura (LEE *et al*., 2003; PIYASENA *et al*., 2003).

4.2. Efeito dos tratamentos de sanitização na microbiota contaminante de hortaliças minimamente processadas

As hortaliças folhosas apresentaram-se mais contaminados com bactérias mesófilas aeróbias do que o tomate cereja e o morango (Tabela 2). Essa maior contaminação de hortaliças folhosas foi reconhecida em outros trabalhos e estimada de ser, em média, 2,8 x 10^5 UFC.g^{-1} (GUENTZEL *et al*., 2008; OIE *et al*., 2008). O número e o tipo de micro-organismos presentes em produtos minimamente processados são muito variados e a contagem de bactérias mesófilas nesses produtos após processamento varia de 10^3 a 10^9 UFC.g^{-1} (FANTUZZI *et al*., 2004; ABADIAS *et al*., 2008b). Segundo Souto (2005), hortaliças como alface, podem facilitar a retenção e a sobrevivência de micro-organismos pela formação de camadas isolantes protetoras na superfície.

Não foi observada diferença significativa nas contagens de mesófilos aeróbios e de fungos filamentosos e leveduras entre hortaliças não sanitizadas e naqueles tratados apenas com água destilada esterilizada (Tabela 2), o que reforça a importância da etapa de sanitização para produtos frescos.

Considerando que os tratamentos de sanitização apresentam limitações na remoção dos micro-organismos contaminantes, sempre que possível é melhor minimizar a contaminação microbiana desses produtos seguindo-se as boas práticas de produção agrícola e de processamento.

No agrião não sanitizado, a contagem de mesófilos foi superior em dois ciclos logarítmicos à registrada por Martins *et al*. (2009). Na salsa, as contagens médias iniciais obtidas no presente estudo foram semelhantes às contagens obtidas por Rosa et al. (2006) que foram em torno de 7 log UFC.g^{-1}.

Tabela 2- Logarítimo da média da contagem de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras (UFC.g^{-1}) em hortaliças não sanitizadas e imersas em água destilada.

	Não sanitizadas*		**Imersas em água destilada***	
Hortaliças	**Mesófilos aeróbios**	**Fungos filamentos e leveduras**	**Mesófilos aeróbios**	**Fungos filamentos e leveduras**
Agrião	6,2 ± 0,82^{a}	3,8 ± 0,58^{e}	6,1 ± 0,76^{a}	3,6 ± 0,45^{e}
Salsa	6,5 ± 0,13^{b}	5,8 ± 0,23^{f}	6,2 ± 0,12^{b}	5,6 ± 0,31^{f}
Morango	4,6 ± 0,24^{c}	5,0 ± 0,41^{g}	4,4 ± 0,33^{c}	4,7 ± 0,36^{g}
Tomate cereja	5,6 ± 0,84^{d}	4,3 ± 0,83^{h}	5,5 ± 0,89^{d}	3,9 ± 0,64^{h}

* Médias ± desvio padrão. Valores seguidos de mesma letra e na mesma linha não apresentaram diferença significativa.

A contaminação inicial de aeróbios mesófilos nas hortaliças analisadas variou de 4,6 log UFC.g^{-1} a 6,5 log UFC.g^{-1} enquanto a contagem de fungos filamentos e leveduras variou de 3,8 UFC.g^{-1} a 5,8 UFC.g^{-1}. Esses valores são próximos aos encontrados por outros autores em salsa (ROSA *et al*., 2006) e tomate cereja (TOURNAS, 2005). Contagens de cerca de dois ciclos log foram registrados na população de aeróbios mesófilos em agrião (MARTINS *et al*., 2009) e, de fungos filamentos e leveduras em morangos (RAGAERT *et al*., 2006).

Os tratamentos de sanitização avaliados em agrião reduziram a população de mesófilos aeróbios e de fungos filamentosos e leveduras em valores que variaram de 0,9 a 6,5, e de 0,6 a 3,3 ciclos logarítmicos, respectivamente (Figura 2).

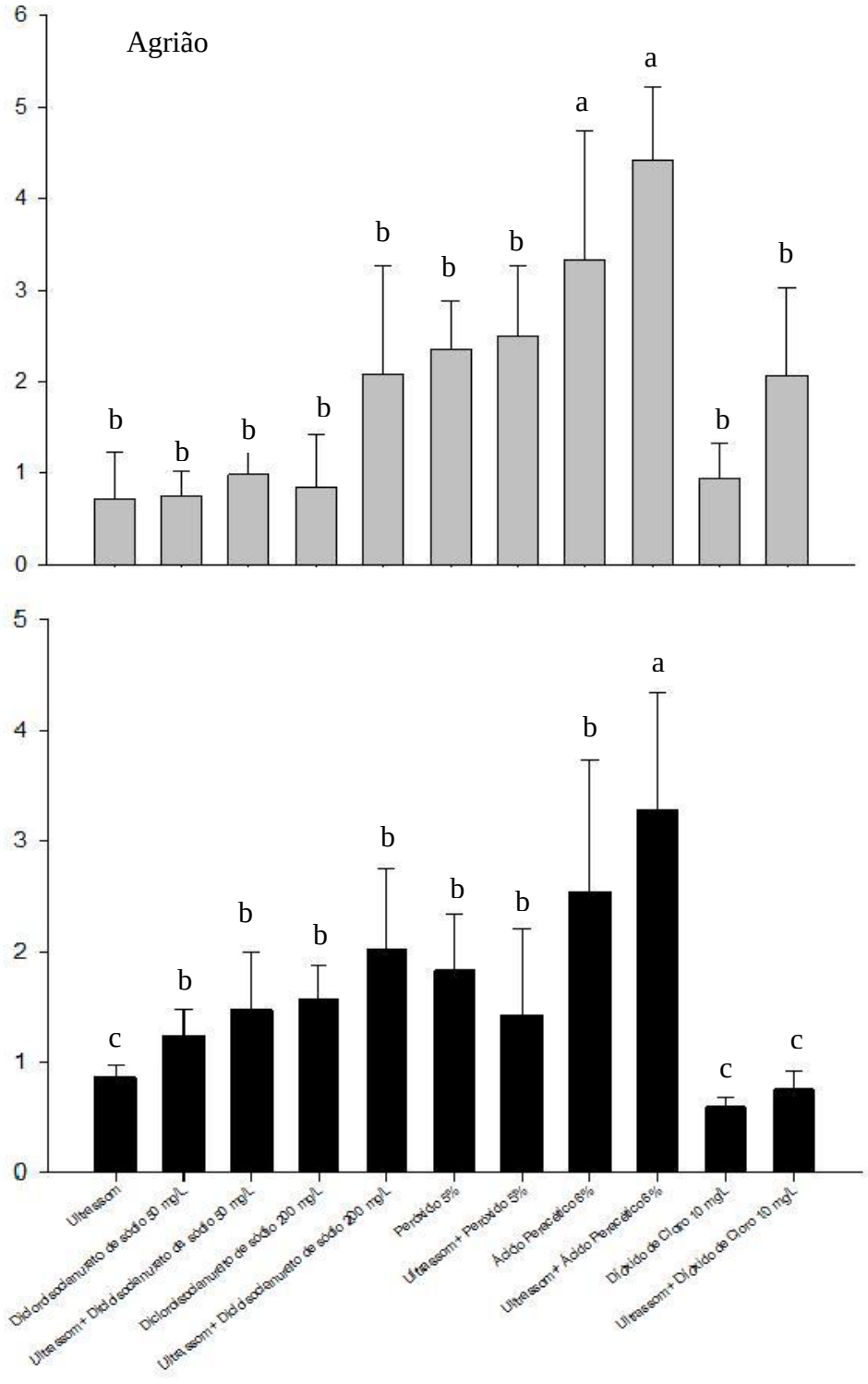

Figura 2 – Número de ciclos logarítmicos reduzidos em relação a contagem inicial de mesófilos aeróbios ( ) e de fungos filamentosos e leveduras ( ) contaminantes de agrião minimamente processado, submetidos à diferentes métodos de sanitização. Tratamentos indicados com mesma letra não diferiram ($p > 0,05$) entre si.

Dicloroisocianurato de sódio na concentração de 50 mg.L^{-1} e 200 mg. L^{-1} foram os tratamentos menos efetivos na sanitização de agrião. Esta redução foi de apenas 0,9 log UFC.g^{-1} na microbiota mesófila aeróbia e inferior a 1,6 log UFC.g^{-1} na população de fungos filamentosos e leveduras. O uso de produtos clorados em concentrações de 50 a 200 mg.L^{-1}, reduziram a população contaminante em um a dois log UFC.g^{-1} em frutas e hortaliças (LEE *et al*., 2004; LEE e BAEK, 2008).

O ultrassom associado aos sanitizantes aumentou a eficiência e promoveu maior redução da população de contaminantes, porém não apresentou efeito sinérgico na redução de mesófilos aeróbios em agrião. Apenas o tratamento no qual foi associado ultrassom com dicloroisocianurato de sódio a 50 mg.L^{-1} diferiu significativamente daquele em que apenas o sanitizante foi usado ($p < 0,05$). Os tratamentos com ultrassom reduziram de 0,8 a 3,3 ciclos logarítmicos na contagem de fungos filamentosos e leveduras.

A redução de contaminantes em torno de dois ciclos log UFC.g^{-1} foi constatada nos tratamentos com peróxido de hidrogênio sem que fossem observadas alterações na coloração do agrião. Ukuku *et al*. (2005) observaram reduções significativas na população de mesófilos aeróbios em melão sanitizado com peróxido de hidrogênio a 2,5%.

As maiores reduções nas populações de contaminantes do agrião foram obtidas quando a solução de ácido peracético foi associada ao ultrassom, sendo que mesófilos aeróbios foram reduzidos na proporção de 6,5 log UFC.g^{-1}, enquanto fungos filamentosos e leveduras em cerca de 3,3 log UFC.g^{-1}. O resultado do presente trabalho foi superior aos apresentados por Allende *et al*. (2008b) que observaram redução de cerca de um log UFC. g $^{-1}$ ao utilizar 80 mg. L^{-1} de produto à base de ácido peracético como o único tratamento de sanitização de chicória.

A utilização do dióxido de cloro aplicado sozinho ou combinado ao ultrassom em agrião, promoveu reduções de 1,3 e 1,7 log UFC.g^{-1} na microbiota mesófila, respectivamente. Esses valores foram inferiores aos resultados obtidos por Huang *et al.* (2006), que trataram alfaces contaminadas com *Salmonella* utilizaram o dióxido de cloro 10 mg.L^{-1} e a combinação desse sanitizante com ultrassom 170 kHz, o que reduziu cerca de 2 e 2,3 log UFC.g^{-1}, respectivamente. Lee e Baek (2008) ao sanitizarem espinafre com 100 mg. L^{-1} de dióxido de cloro, observaram redução de 2,6 log UFC.g^{-1} de *E. coli* O157:H7. A redução observada no presente estudo pode ser justificada pela aplicação de concentração 10 vezes menor do sanitizante comparada ao utilizado por Lee e Baek (2008).

Tratamentos com dióxido de cloro promoveram reduções menores do que um log UFC g^{-1} na população de fungos filamentosos e leveduras de agrião, apesar do dióxido de cloro ser considerado um potente agente oxidante (SINGH *et al*., 2003; ARTÉS *et al*., 2007). O comprometimento da eficiência do dióxido de cloro pode estar associado ao fato de ser um composto altamente instável e que perde eficiência quando exposto a temperaturas superiores a 30 ºC e à luz (TAYLOR *et al*., 1998). No presente trabalho, o produto foi fornecido pelo fabricante e armazenado em condições adequadas. A razão para baixa eficiência do sanitizante pode ser ainda justificada pela baixa concentração empregada.

Reduções das populações de mesófilos aeróbios e de fungos filamentosos e leveduras contaminantes de salsa variaram de 0,9 a 6,3 log UFC.g^{-1} e de 1,0 a 4,6 log UFC.g^{-1}, respectivamente (Figura 3).

A solução de dicloroisocianurato de sódio a 200 mg.L^{-1} promoveu redução de cerca de 2 log UFC.g^{-1} na população de mesófilos aeróbios em salsa minimamente processada e este resultado evidencia que o efeito dos sanitizantes varia com o produto e

com a microbiota contaminante. Allende *et al*. (2008a) obtiveram redução de um log UFC.g^{-1} com a utilização do sanitizante à base de cloro na população de *E. coli* e na população de mesófilos aeróbios em coentro minimamente processado. A combinação de ultrassom e dicloroisocianurato de sódio a 50 mg.L^{-1} e o uso do clorado organico a 200 mg.L^{-1} promoveram redução de um log UFC.g^{-1} na população de fungos filamentosos e leveduras em salsa.

Tratamentos contendo peróxido de hidrogênio promoveram reduções de cerca de 2 log UFC.g^{-1} na contagem inicial de fungos filamentosos e leveduras, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Ahmed e Russel (1975) afirmaram que a combinação de ondas ultrasônicas e peróxido de hidrogênio torna-se mais letal do que cada tratamento isolado.

Similar ao resultado encontrado no agrião, a maior redução na população de mesófilos de salsa foi obtida ao utilizar o ácido peracético e ultrassom combinados ou não e que contribuíram, respectivamente, para redução de 6,3 e 5,1 log UFC.g^{-1} (Figura 3). Estes mesmos tratamentos promoveram reduções iguais a 3,9 log UFC.g^{-1} e 4,8 log UFC.g^{-1} na população de fungos filamentosos e leveduras na salsa (Figura 3).

A população de mesófilos aeróbios apresentou redução de 0,9 a 2 log UFC.g^{-1}, quando a hortaliça foi sanitizada com os demais tratamentos não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p>0,05$). A menor redução de mesófilos aeróbios foi obtida com utilização do ultrassom (0,9 log UFC.g^{-1}), sendo este resultado inferior ao de Seymour *et al*. (2002), que observaram reduções de 1,6 e 1,7 log UFC.g^{-1} de *Salmonella* Typhimurium em alface e de 0,3 a 0,9 log UFC.g^{-1} em salsa contaminada com *E. coli*.

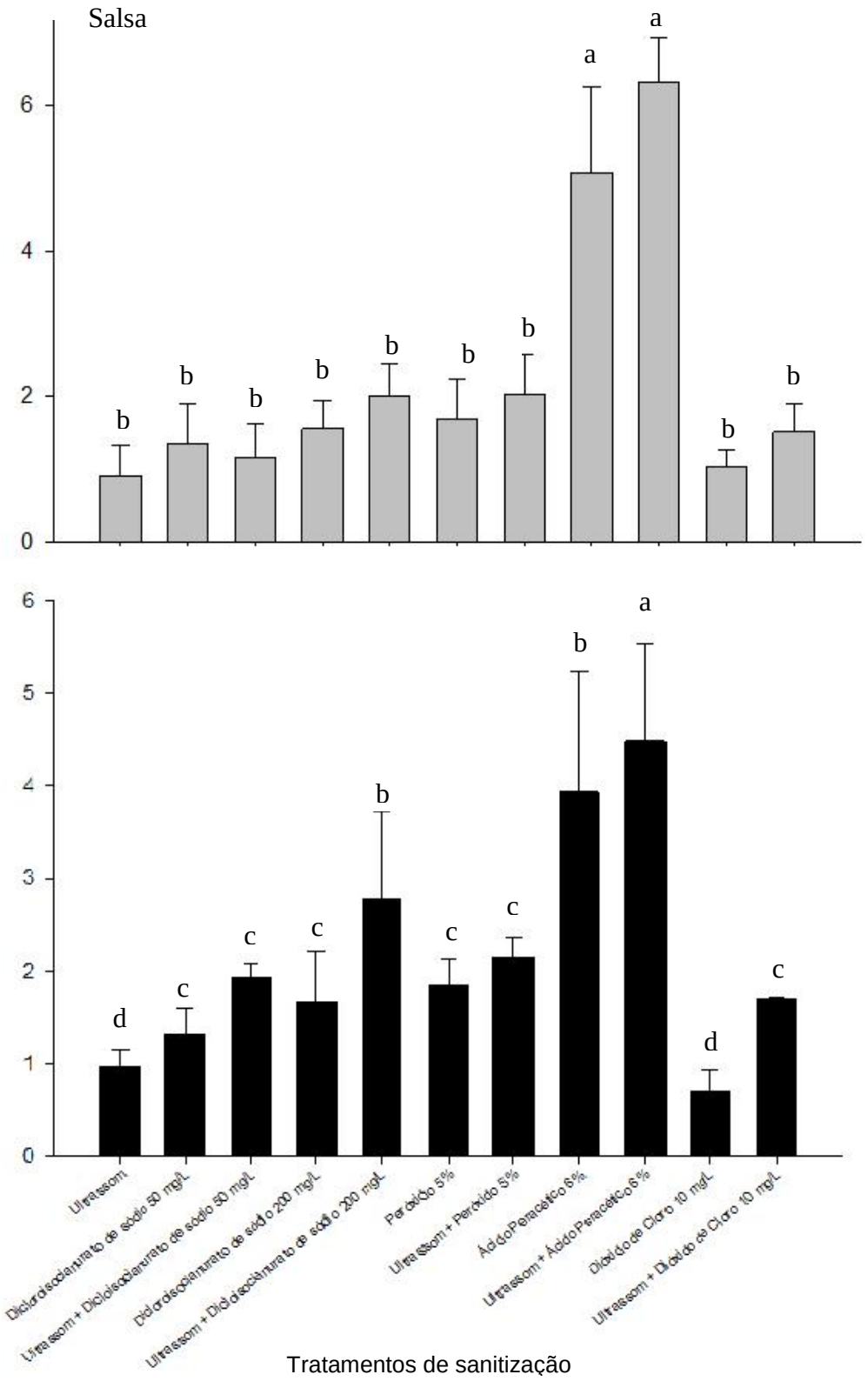

Figura 3 – Número de ciclos logarítmicos reduzidos em relação à contagem inicial de mesófilos aeróbios (▒) e fungos filamentos e leveduras (■) contaminantes de salsa minimamente processada, submetidos à diferentes métodos de sanitização. Tratamentos indicados com mesma letra não diferiram ($p > 0,05$) entre si.

Os tratamentos com dióxido de cloro e ultrassom reduziram, respectivamente, 0,7 log UFC.g^{-1}e um log UFC.g^{-1} ($p < 0,05$) na contagem de fungos filamentosos e leveduras (Figura 3). Esta baixa redução promovida pelo ultrassom pode ser justificada pelo fato de fungos filamentosos e leveduras serem mais resistentes a tratamentos com ultrassom de alta intensidade do que células vegetativas de bactérias (LÓPEZ-MALO *et al.*, 2005).

A população inicial de mesófilos aeróbios em morangos foi reduzida de 0,7 a 4,0 ciclos logarítmicos após diferentes tratamentos de sanitização (Figura 4).

Os tratamentos com dicloroisocianurato de sódio a 50 e a 200 mg. L^{-1} promoveram reduções de 0,7 e 1,4 log UFC.g $^{-1}$, respectivamente na contaminação de morangos. Sapers *et al*. (2001) também obtiveram redução inferior a um ciclo log na contagem de mesófilos aeróbios quando trataram melão com 1000 mg.L^{-1} de solução clorada. A utilização do ultrassom na sanitização de morangos promoveu redução de um log UFC.g^{-1} na população de mesófilos aeróbios e não implicou em alteração da coloração do produto. Esse tratamento reduziu 1,1 log UFC.g^{-1} na população de fungos filamentosos e leveduras, resultado semelhante à redução promovida na microbiota mesófila. Seymour *et al*. (2002) observaram reduções de 0,7 a 1,4 log UFC.g^{-1} de *E. coli*, em morangos tratados com ultrassom por 10 minutos.

Os tratamentos com ultrassom, em condição que não prejudicam propriedades sensoriais e nutricionais, não são completamente eficientes para inativar micro-organismos presentes. Assim, essa limitação sugere a combinação do ultrassom com outros tratamentos antimicrobianos para maior inativação de micro-organismos (LÓPEZ-MALO *et al*., 2007).

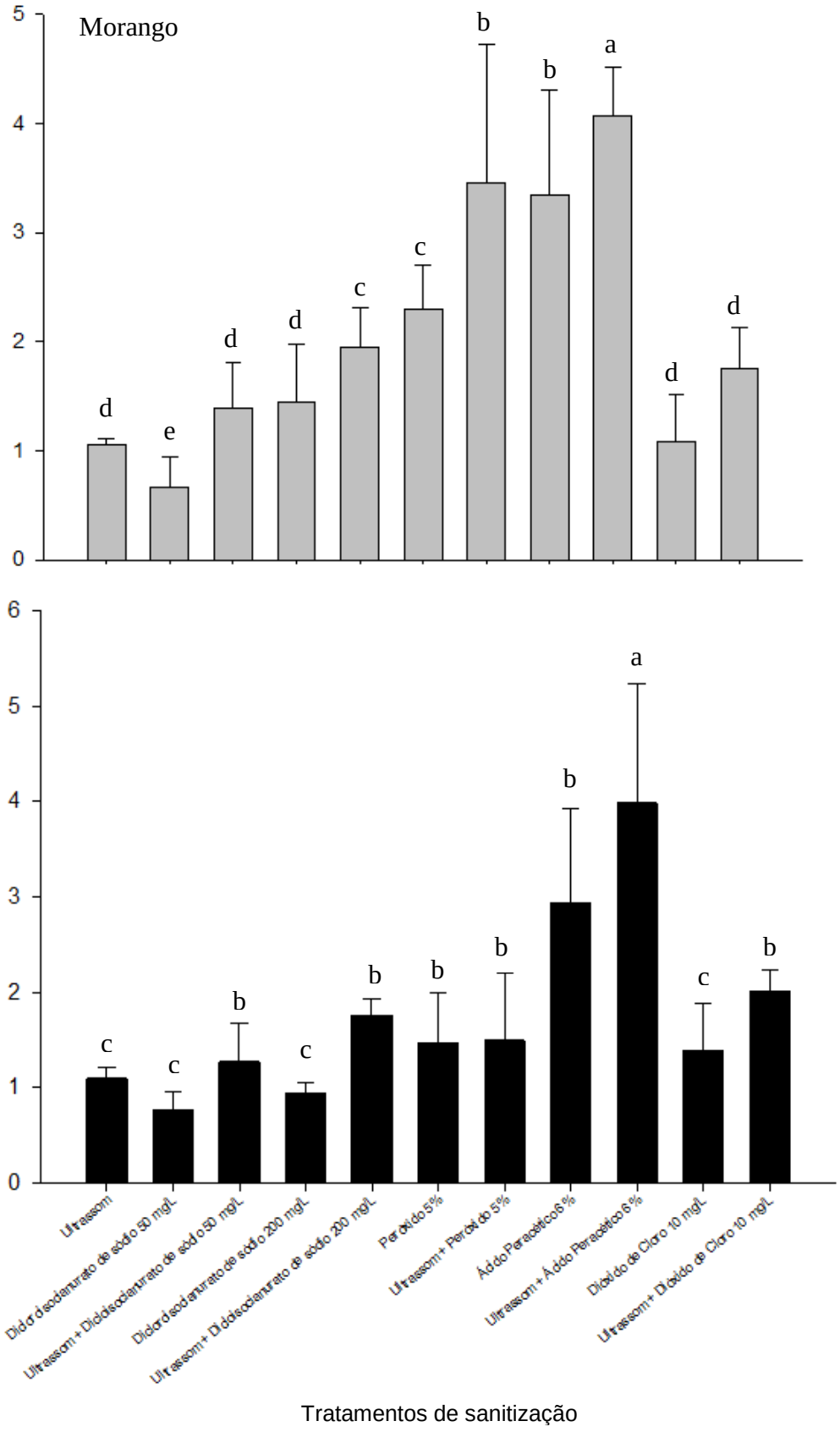

Figura 4 – Número de ciclos logarítmicos reduzidos na contagem inicial de mesófilos aeróbios (▭) e fungos filamentosos (■) contaminantes de morango minimamente processado, submetidos à diferentes métodos de sanitização. Tratamentos indicados com mesma letra não diferiram (p > 0,05) entre si.

No presente estudo, combinações de ultrassom com sanitizantes promoveram maior redução na população de contaminantes do que o uso dos mesmos de forma isolada. As reduções obtidas pela combinação do ultrassom com dicloroisocianurato de sódio a 50 $mg.L^{-1}$, dicloroisocianurato de sódio a 200 $mg.L^{-1}$, dióxido de cloro a 10 $mg.L^{-1}$ e ácido peracético a 40 $mg.L^{-1}$, foram iguais a 1,4; 2; 2,1 e 4 log $UFC.g^{-1}$, respectivamente.

Vale destacar que o tratamento que combinou ultrassom e dicloroisocianurato de sódio à 50 $mg.L^{-1}$, promoveu redução de um log $UFC.g^{-1}$ na população de fungos filamentosos e leveduras resultado este semelhante ao do tratamento com dicloroisocianurato de sódio à 200 $mg.L^{-1}$. A combinação dos tratamentos permitiu o uso de uma menor concentração do sanitizante para obtenção de uma mesma redução da microbiota. Este fato é importante já que existem indicações para o não uso desse sanitizante ou, utilização em menores concentrações, em função das implicacões ambientais de seus subprodutos (MARTÍN-DIANA et al., 2006; RICO et al., 2007; RUIZ-CRUZ et al., 2007; SELMA et al., 2008).

O emprego do ultrassom associado ao tratamento com peróxido de hidrogênio promoveu redução de 3,4 log $UFC.g^{-1}$ da microbiota mesófila presente em morango. Esta redução foi superior a 1,5 log $UFC.g^{-1}$ obtida com mesmo tratamento na população de fungos filamentosos e leveduras.

A combinação de ácido peracético à 40 $mg.L^{-1}$ com ultrassom com freqüência igual à 45 kHz reduziu 4,1 log $UFC.g^{-1}$ no número de mesófilos aeróbios em morangos ($p < 0,05$) e de quase 4 log $UFC.g^{-1}$ na população de fungos filamentosos e leveduras.

Morangos tratados com dióxido de cloro e ultrassom associado a esse sanitizante apresentaram reduções de 1,4 e 2,0 log $UFC.g^{-1}$, respectivamente. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Wu e Kim (2007) que utilizaram dióxido de cloro aquoso à

5 a 10 mg.L^{-1} e observaram redução 1,2 a 2,4 UFC.g^{-1} na população de fungos filamentosos e leveduras de mirtilo.

A população inicial de mesófilos aeróbios em tomate cereja foi reduzida de 0,7 a 4,4 ciclos logarítmicos após diferentes tratamentos de sanitização (Figura 5). Tratamentos com dicloroisocianurato de sódio à 50 e 200 mg.L^{-1} não promoveram reduções superiores à um log UFC.g^{-1} de mesófilos aeróbios. Ultrassom combinado ao dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L^{-1} reduziu 2,1 log UFC.g^{-1}, sendo este valor superior a soma das reduções promovidas por cada tratamento de forma isolada o que indicou um efeito sinérgico. Este mesmo tratamento não foi mais efetivo para a descontaminação de fungos filamentosos e leveduras em tomates.

O peróxido de hidrogênio quando aplicado isoladamente e em combinação com o ultrassom mantiveram a redução dos contaminantes na faixa de 2,1 a 2,6 log UFC.g^{-1}.

A maior redução, de 4,4 log UFC.g^{-1}, foi promovida pelo tratamento em que foi combinado ultrassom e ácido peracético à 40 mg.L^{-1}. Uma vantagem importante do uso do ácido peracético é o fato de que este composto não oferece risco ao ambiente e não produz compostos tóxicos ao reagir com matéria orgânica (ROSSINI e GAYLARDE, 2000). Nos resultados observados por Kim *et al*. (2006) foi evidenciada a redução de 3,6 log UFC de *Enterobacter sakazakii* por tomate ao tratá-los apenas com ácido peracético.

Os tratamentos de sanitização aplicados nos tomates cereja promoveram reduções de 1,1 a 3,4 log UFC.g^{-1} na população de fungos filamentosos e leveduras e a maior redução foi observada ao combinar ultrassom ao ácido peracético à 40 mg.L^{-1} . Dicloroisocianurato de sódio 50 mg.L^{-1}, dicloroisocianurato de sódio à 200 mg.L^{-1}, dióxido de cloro à 10 mg.L^{-1}, ultrassom e ultrassom combinado ao dióxido de cloro 10 mg.L^{-1}, promoveram reduções de 1,0; 1,1; 0,9; 1,3 e 1,4 log UFC. g^{-1}, respectivamente.

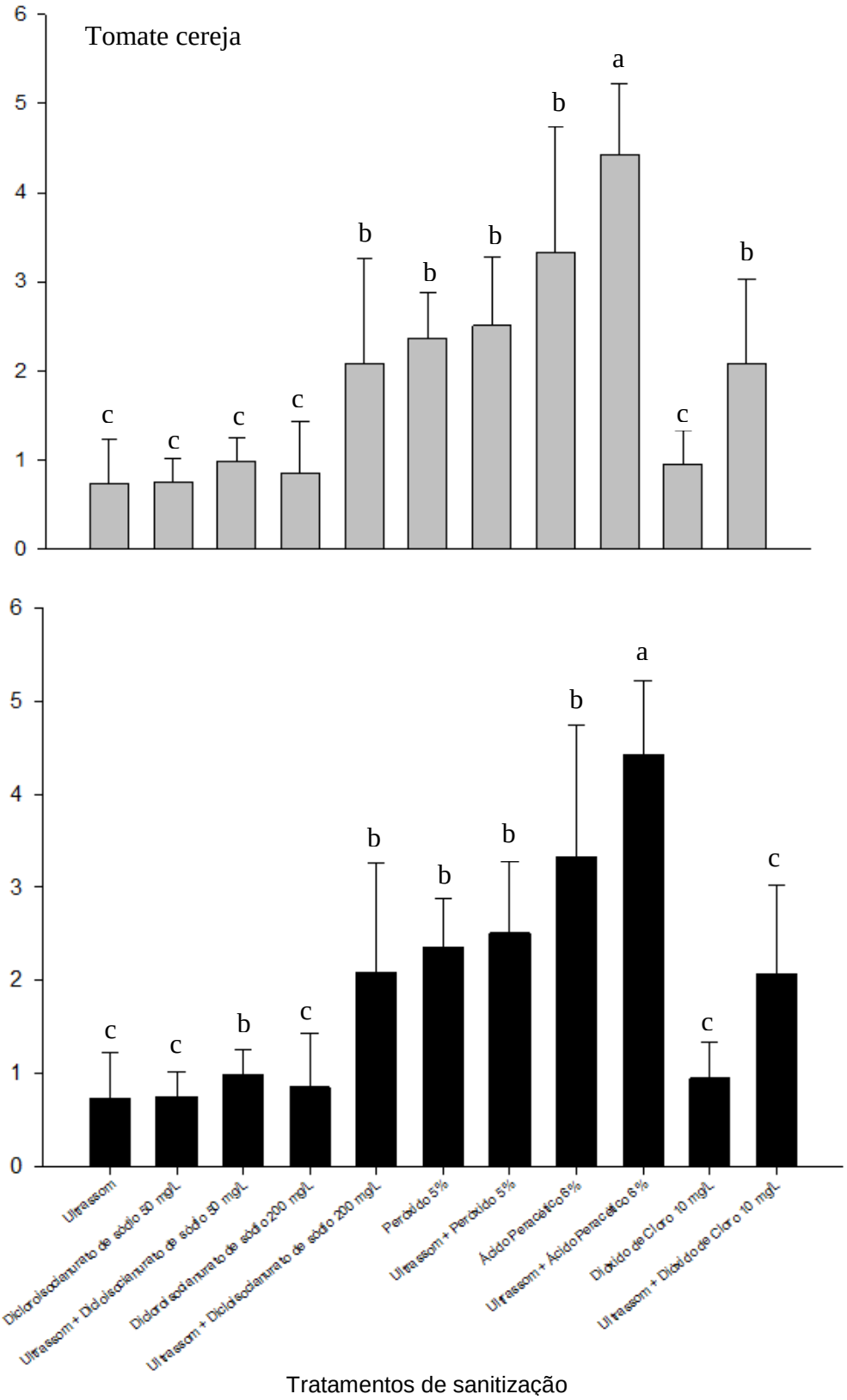

Figura 5– Número de ciclos logarítmicos reduzidos na contagem inicial de mesófilos aeróbios (▭) e fungos filamentosos e leveduras (■) contaminantes de tomate cereja minimamente processado, submetidos à diferentes métodos de sanitização. Tratamentos indicados com mesma letra não diferiram (p > 0,05) entre si.

A soma da redução promovida pelo tratamento com ultrassom no tomate cereja, que foi de 0,7 log UFC.g^{-1}, com o valor de 0,9 log UFC.g^{-1} obtida com o dióxido de cloro, foi inferior a redução obtida com os tratamentos combinados que foi igual a 2,1 log UFC.g^{-1}. Este resultado indicou efeito sinérgico do ultrassom com dióxido de cloro. Este mesmo efeito também pôde ser observado no tratamento com dicloroisocianurato de sódio. A intensa pressão gerada durante o uso do ultrassom pode contribuir para a penetração de oxidantes químicos através da membrana celular e o processo de cavitação auxilia na desagregação de micro-organismos, o que culmina no aumento da eficiência do sanitizante (GOGATE e KABADI, 2009).

Apesar das diferenças na redução de contaminantes entre as hortaliças estudadas tratamento com ácido peracético combinado ao ultrassom apresentou melhores resultados, com maior redução de número de mesófilos aeróbios e de fungos filamentosos e leveduras. Fatores relacionados aos produtos, como área de contato, anatomia e micro-estrutura dos tecidos vegetais podem influenciar na efetividade dos sanitizantes.

4.3. Adesão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 à superfície de tomate cereja

A observação microscópica de cortes de tomate cereja incubados em cultura de *Salmonella* Typhimurium por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas indicou a presença de células aderidas à superfície do vegetal (Figura 6). Apesar de alguns estudos indicarem que micro-organismos aderem-se preferencialmente a tecidos danificados (SEO e FRANK, 1999; BURNETT et al., 2000; HAN et al., 2000), no presente trabalho observou-se que *Salmonella* aderiu à superfície intacta do tomate cereja.

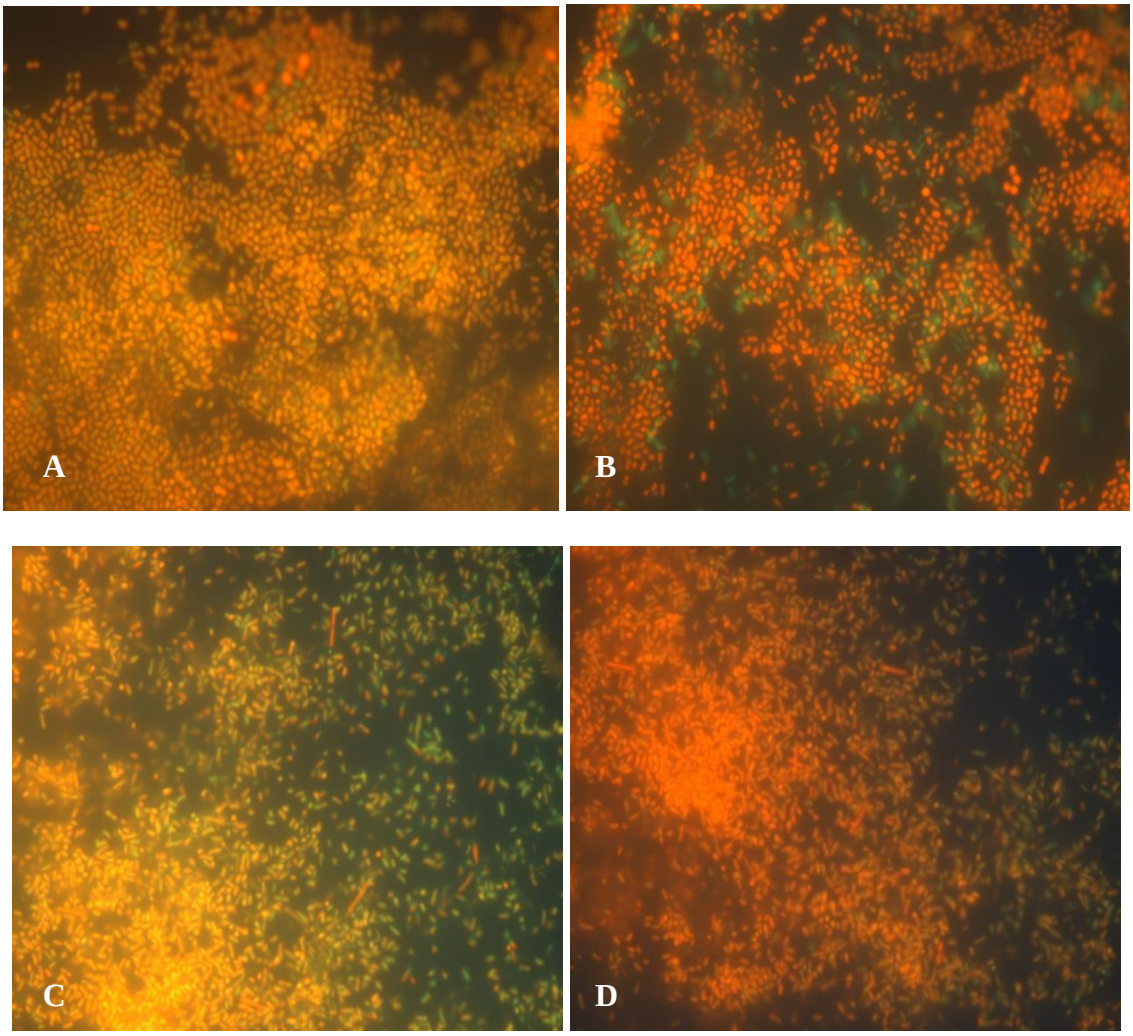

Figura 6 - Fotomicrografias de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja, feitas por microscopia de epifluorescência, após incubação a 25 °C por 24(A), 48(B), 72(C) e 96 horas (D).

Han *et al*. (2000) sugeriram que células de *E. coli* O157:H7 aderiram à superfícies intactas de pimentões possivelmente em função da remoção de parte da camada de cera ou à presença de lesões naturais no vegetal.

O fato de *Salmonella* crescer e formar biofilmes na superfície de tomate e de outros alimentos dificulta a ação do sanitizante. O mecanismo de adesão microbiana ainda não é completamente entendido, mas sugere-se que interações hidrofóbicas entre a

camada da epiderme e os micro-organismos facilitam a adesão em cutículas rompidas, estômatos, lenticelas e tricomas (BURNETT e BEUCHAT, 2001; SEYMOUR *et al*., 2002). A capacidade de patógenos aderirem fortemente à epiderme de folhas pode reduzir a eficiência dos tratamentos de descontaminação e a inativação microbiana completa não é possível (ALLENDE *et al*., 2008c).

Na contagem de células aderidas à superfície do tomate cereja observaram-se populações iniciais de *Salmonella* Typhimurium entre 6,7 a 7,7 log UFC.g^{-1}. Não foi constatada diferença significativa da população durante os tempos de incubação de 24 até 96 horas ($p > 0,05$), optou-se por trabalhar com o tempo de incubação de 48 horas.

Os tomates cereja contaminados com *Salmonella* Typhimurium mantidos por 48 horas em caldo LB foram submetidos a tratamentos de sanitização e observou-se que as soluções de dicloroisocianurato de sódio e de ácido peracético foram ineficientes para remoção de células aderidas à superfície (Figura 7).

O dicloroisocianurato de sódio na concentração de 200 mg.L^{-1}, aplicado por 10 minutos, reduziu apenas 0,4 log UFC.g^{-1} da população de *Salmonella* Tyhpimurium ATCC 14028 (Tabela 4). Estes resultados diferem do observado por Rodgers et al. (2004), quando o uso de 200 mg. L^{-1} de cloro após cinco minutos de exposição reduziu a população de *E. coli* O157:H7 a valores não detectáveis em maçãs, alface, morango e melão. Usando o mesmo sanitizante, Velázquez *et al*. (2009) verificaram redução de 4,77 log UFC de *Yersinia enterocolitica* em tomates. De fato, outros estudos constatam que tratamentos químicos como soluções cloradas, peróxido de hidrogênio, álcool e detergentes reduzem parcialmente a população de patógenos presentes em vegetais (RAYNER *et al*., 2004; LAPIDOT *et al*., 2006).

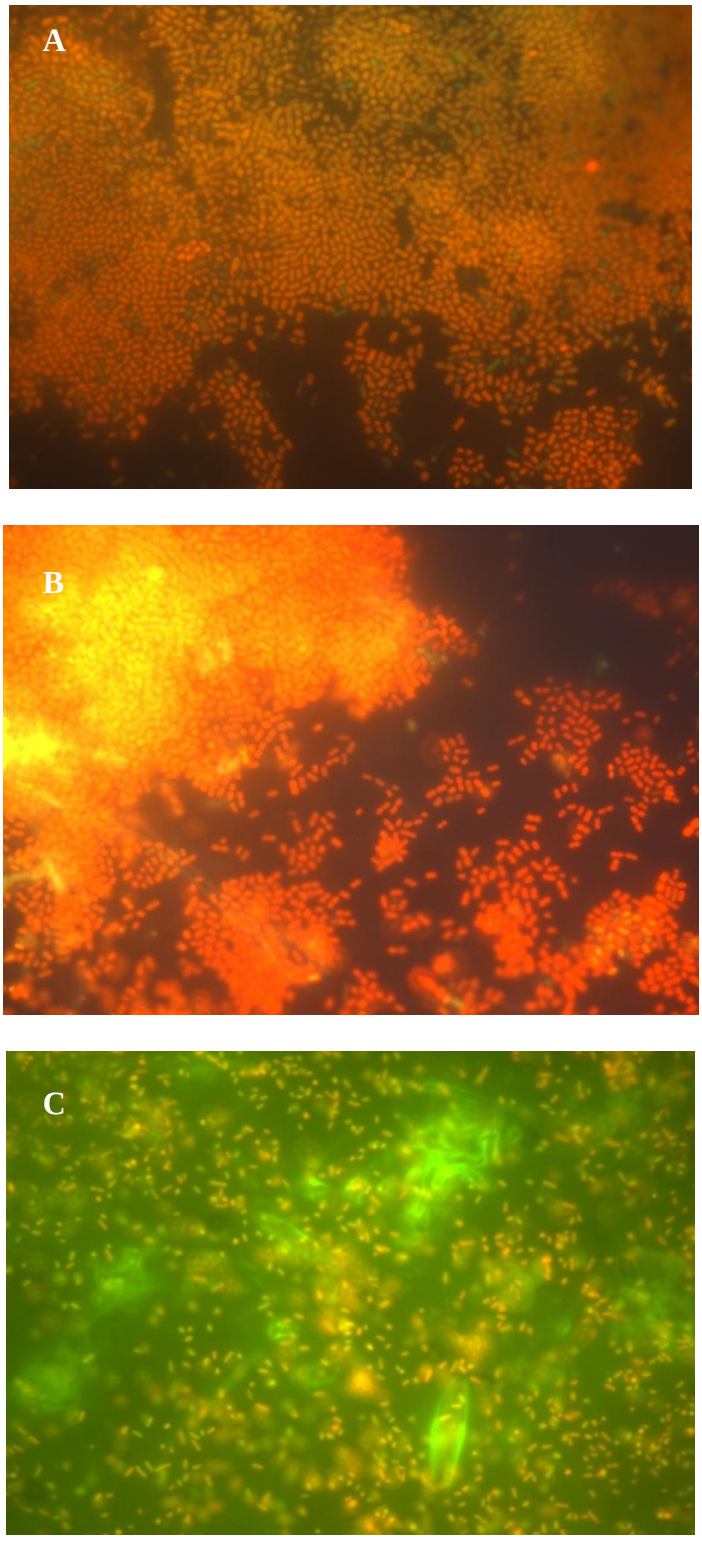

Figura 7 - Fotomicrografias de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja após incubação por 48 horas a 25 °C, submetidos à diferentes tratamentos, feitas por microscopia de epifluorescência: (A) Não Sanitizado, (B) Sanitizado com dicloroisocianurato de sódio 200 $mg.L^{-1}$ por 10 minutos, (C) Sanitizado com ácido peracético por 10 minutos. Aumento de 1000 x.

Tabela 4 – Efeito dos tratamentos de sanitização na redução da população de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em tomates cereja.

Tratamento	**Tempo (min)**	**Log UFC.g^{-1*}**	**Redução Log UFC.g^{-1}**
Não sanitizado	0	7,63^{a} ± 0,49	-
Dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L^{-1}	10	7,22^{a} ± 0,64	0,41
Ácido peracético 40 mg.L^{-1}	10	4,90^{c} ± 0,93	2,73
Ultrassom 45 kHz	10	6,80^{b} ± 0,66	0,83
Ultrassom 45 kHz	20	6,41^{b} ± 1,13	1,22
Ultrassom 45 kHz	30	5,90^{b} ± 0,65	1,73
Ultrassom 45 kHz + Ácido peracético	10	3,75^{c} ± 0,17	3,88

* Médias ± Desvio Padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si ($p > 0,05$).

A incapacidade dos sanitizantes em removerem totalmente os micro-organismos da superfície de frutas e hortaliças evidencia a possibilidade de crescimento microbiano durante a estocagem e ainda, sugere a chance de que células do patógeno permaneçam em sítios protegidos na superfície vegetal ou em biofilmes pré-existentes.

Nas Figuras 8 e 9, feitas em microscopia de epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente, é possível observar a redução de células aderidas à superfície do tomate cereja após tratamentos com ultrassom combinado ao ácido peracético e o tratamento apenas com ultrassom por 30 minutos.

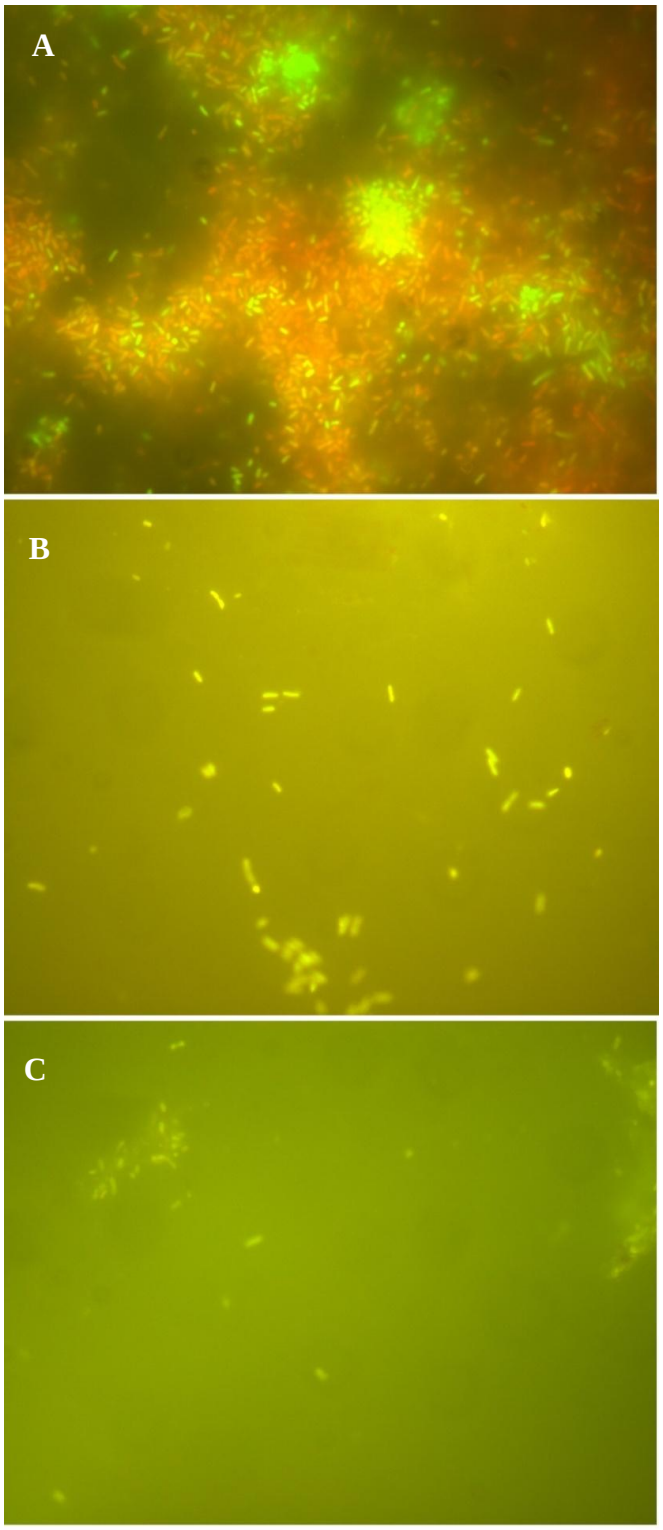

Figura 8 - Fotomicrografias de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja observadas por microscopia de epifluorescência: Não sanitizado (A), após sanitização com ácido peracético 40 $mg.L^{-1}$ combinado ao ultrassom por 10 minutos (B), após tratamento com ultrassom 45 kHz por 30 minutos (C). Aumento de 1000 x.

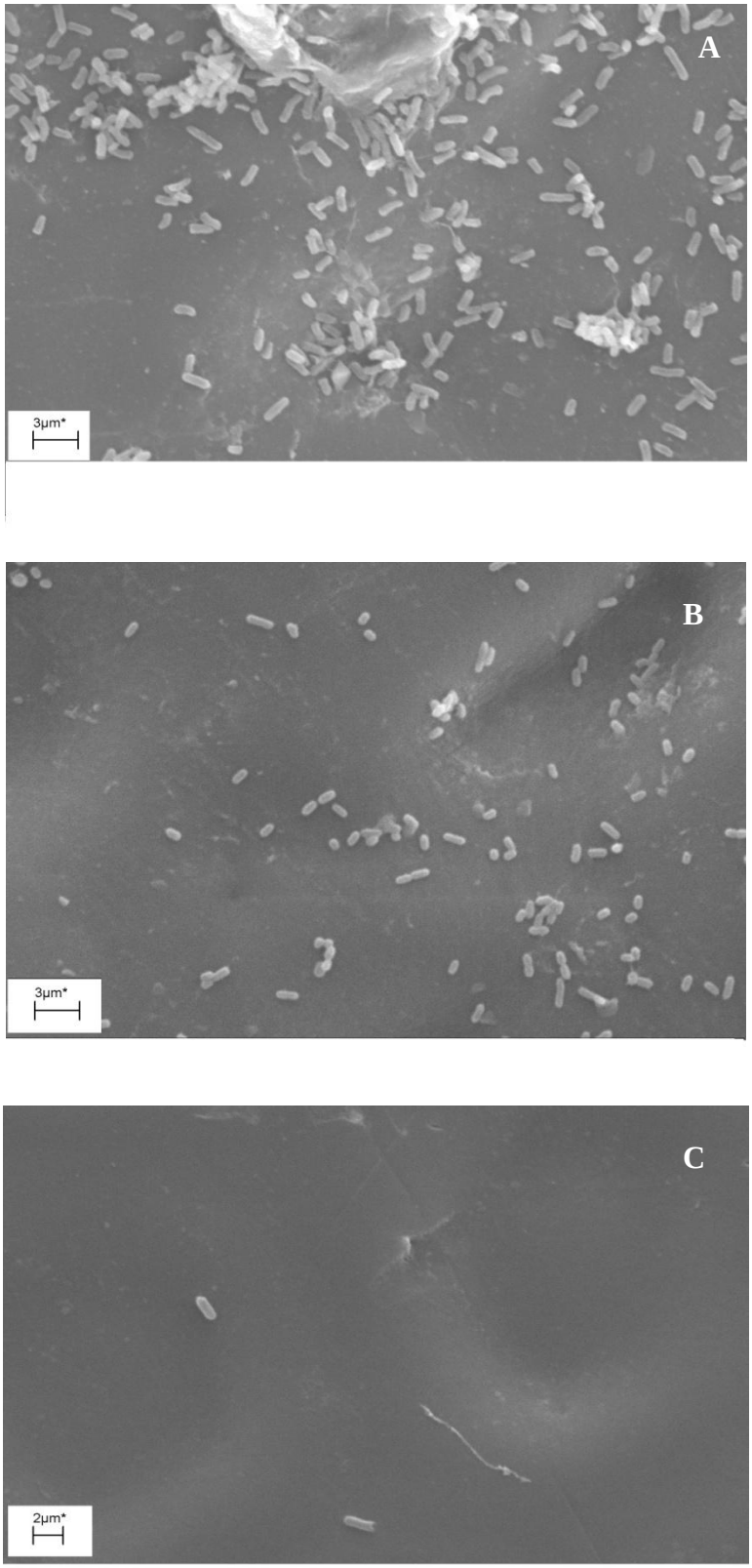

Figura 9 - Fotomicrografias de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja observadas por microscopia eletrônica de varredura: Não sanitizado (A), após sanitização com ácido peracético 40 $mg.L^{-1}$ combinado ao ultrassom por 10 minutos (B) após tratamento com ultrassom 45 kHz por 30 minutos (C).

A constatação da existência de algumas células aderidas e que não foram detectadas na contagem em placas pode indicar formas não cultiváveis ou inativadas pelo tratamento. Sabe-se que algumas células se mantêm intactas e viáveis, entretanto não podem ser cultiváveis, mas essas são de importância na saúde humana e animal, pois a maioria retém potencial patogênico e infeccioso (GUPTE *et al*., 2003). Jolivet-Gougeon *et al*. (2006) destacaram a importância de estudar *Salmonella* tratada com ácido peracético pois essa bactéria é capaz de modificar suas características fisiológicas, incluindo entrar em estado viável não cultivável e de manter sua virulência após a permanência em efluentes de esgoto tratados com esse sanitizante.

As imagens D, E e F, feitas em microscopia eletrônica de varredura (Figura 10), confirmaram o efeito do ultrassom na remoção de células aderidas à superfície e como uma alternativa na descontaminação de vegetais frescos. Esta alternativa havia sido considerada por outros autores, como Seymour *et al*. (2002) e Huang *et al*.(2006).

A aplicação de ultrassom na freqüência 45 kHz por 10, 20 e 30 minutos, promoveu reduções de 0,8, 1,2 e 1,7 log UFC.g^{-1} em tomates cerejas contaminados com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Este resultado indica que o acréscimo de tempo de sonicação implica em maior número de ciclos log reduzidos. Apesar da maior redução, avaliações preliminares devem ser realizadas com intuito de verificar se o maior tempo de sonicação acarretará danos na qualidade do produto sanitizado.

Foi avaliado, ainda, o efeito do ultrassom combinado a 40 mg. L^{-1} ácido peracético em *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderida à superfície de tomate cereja e observou-se redução de quase 4 log UFC.g^{-1}. Huang *et al*. (2006) observaram que a eficiência do ultrassom 170 kHz na remoção de bactérias aderidas a maçãs foi maior em *Salmonella* do que em *E. coli* O157:H7. Esses autores observaram que a combinação de tratamentos químicos e ultrassom promoveu maior redução na

população contaminante de vegetais. Gogate e Kabadi (2009) também concluíram que, quando o ultrassom é empregado associado com agentes químicos pode aumentar a eficiência de sanitizantes.

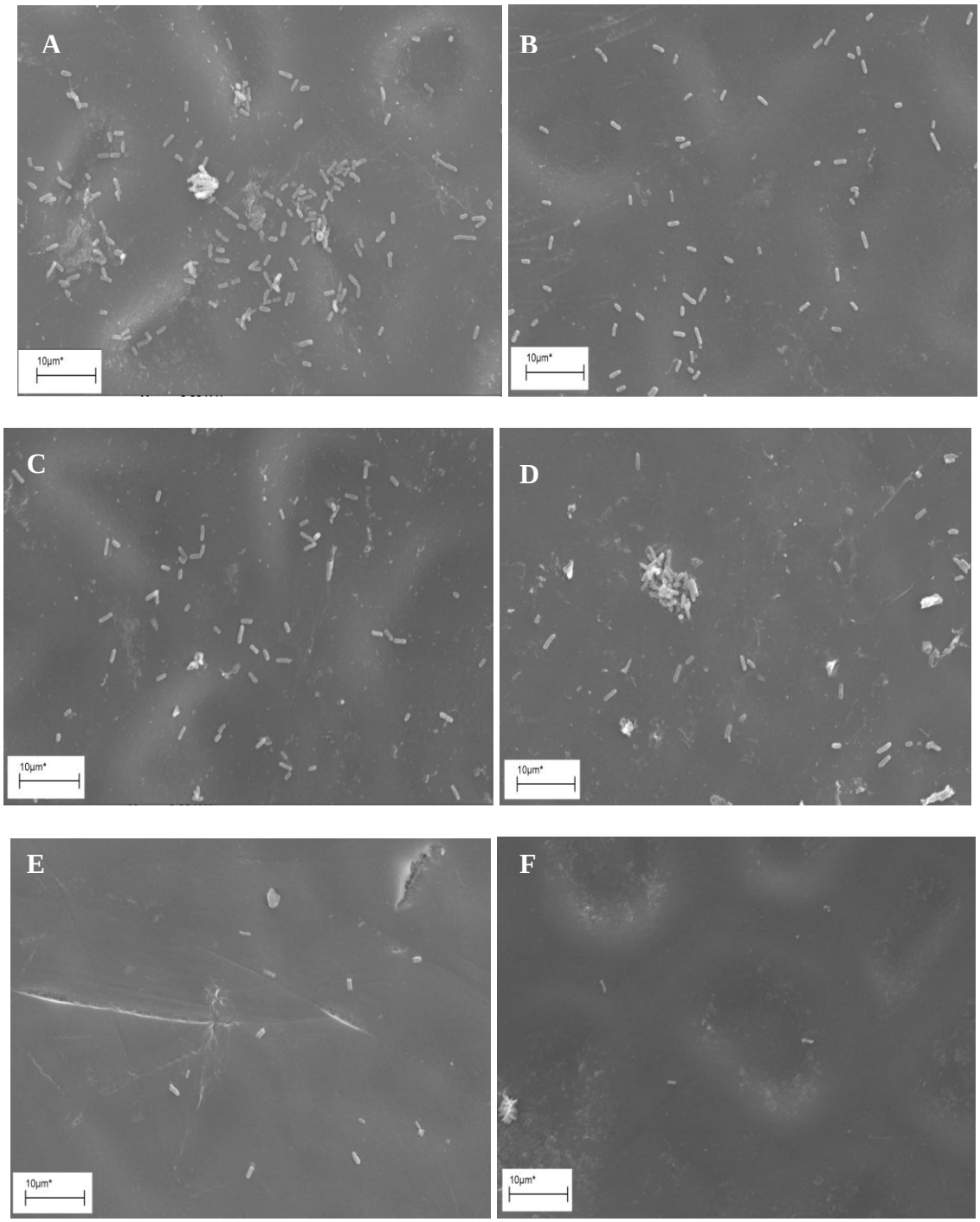

Figura 10- Fotomicrografias de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja observadas por microscopia eletrônica de varredura: Não sanitizado (A), após sanitização com ácido peracético 40 mg.L^{-1} (B), dicloroisocianurato de sódio 200 mg. L^{-1} (C), Ultrassom 45 kHz por 10 minutos (D), Ultrassom 45 kHz por 20 minutos (E) e Ultrassom 45 kHz por 30 minutos (F).

Em observação microscópica após 96 horas de incubação do tomate cereja na cultura de *Salmonella* Tyhpimurium, foi possível observar grande adesão de células em determinados pontos da superfície da hortaliça, como apresentado na Figuras 11 A. Em determinados campos de observação foi possível observar a formação de matriz exopolissacarídica, característica da formação de biofilme.

Mesmo com a grande a adesão de células e com indícios de biofilme formado, o tratamento com ultrassom por 30 minutos foi capaz de remover consideravelmente, as células da superfície do tomate cereja (Figuras 11 B).

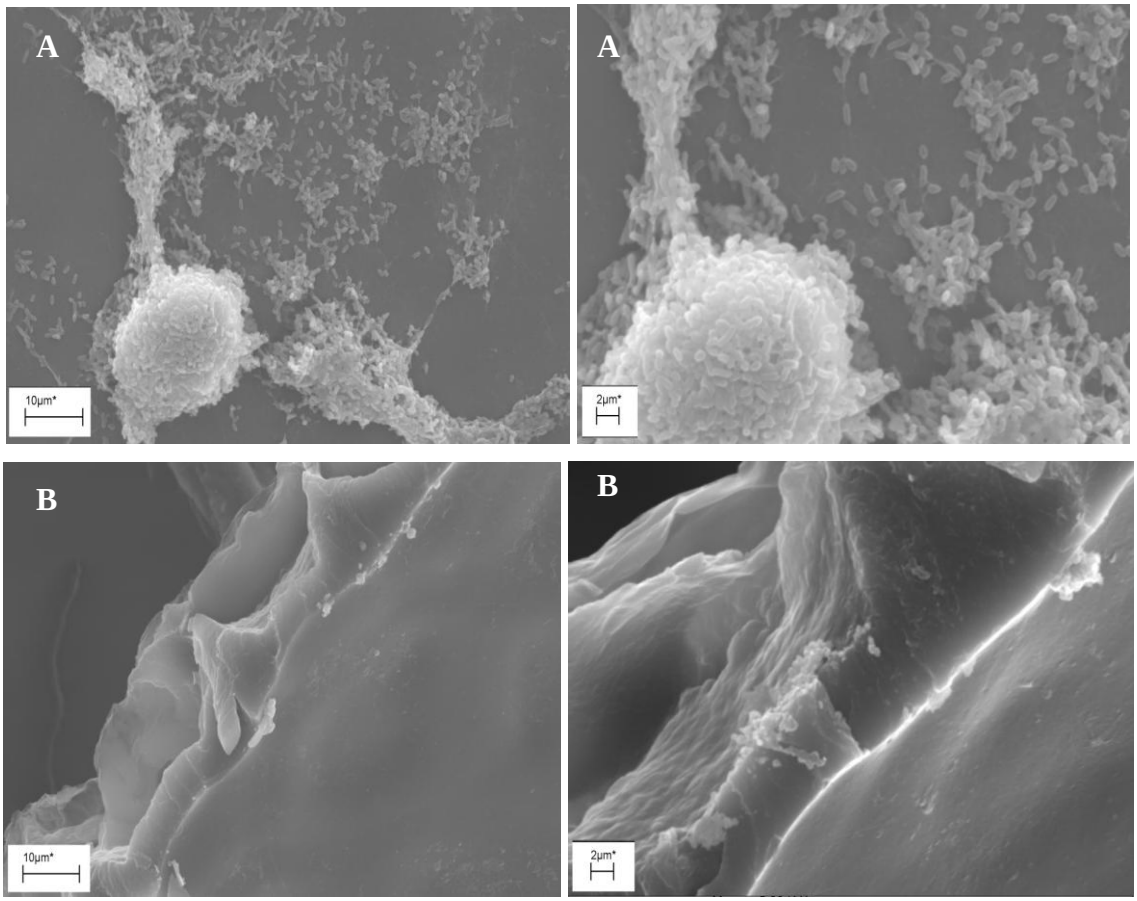

Figura 11 - Fotomicrografias de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderidas à superfície de tomate cereja observadas por microscopia eletrônica de varredura: Não sanitizado com 96 horas de incubação (A), após tratamento com ultrassom 45 kHz por 30 minutos (B).

5. CONCLUSÕES

O tratamento de ultrassom como sanitizante promoveu reduções de cerca de um ciclo logarítmico na população de aeróbios mesófilos e de fungos filamentosos e leveduras contaminantes de agrião, salsa, morango e tomate cereja. A associação deste tratamento com dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e dióxido de cloro contribuiu para maior redução da microbiota contaminante das hortaliças quando comparada ao tratamento em que utilizou-se apenas as soluções sanitizantes. A combinação do tratamento com ultrassom ao dióxido de cloro à 10 $mg.L^{-1}$ em tomate cereja promoveu efeito sinérgico.

O tratamento no qual se combinou ácido peracético com ultrassom mostrou ser o mais eficiente na redução de mesófilos aeróbios e de fungos filamentosos e leveduras nas hortaliças utilizadas. Entretanto, foi observada alteração de coloração e de odor após a sanitização dos morangos. O tratamento com ultrassom não provocou alterações visíveis nas hortaliças minimamente processadas, o que indicou potencial para sua aplicabilidade nestes alimentos.

Com a utilização da microscopia de epifluorescência e da microscopia de varredura foi observado que as células de *Salmonella* podem aderir à superfície intacta de tomate cereja. O tratamento com ácido peracético combinado com ultrassom foi o mais eficiente e reduziu a população de *Salmonella* em tomate cereja em, aproximadamente, 4 log $UFC.g^{-1}$. Os tratamentos com ultrassom por 10, 20 e 30

minutos, também contribuíram para a redução do patógeno aderido à superfície da hortaliça, em aproximadamente 2 log UFC.g^{-1}.

Foi possível verificar neste estudo que o tratamento com ultrassom apresentou efeito aditivo na remoção de micro-organismos contaminantes de hortaliças, sendo sua eficiência variada, de acordo com o tipo de hortaliça, tempo de exposição e com o sanitizante aplicado em combinação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p. 121-129, 2008a.

ABADIAS, M.; USALL, J.; OLIVEIRA, M.; ALEGRE, I.; VIÑAS. I. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology,** v. 123, n.1-2, p.151-158, 2008b.

AHMED, F.I.K.; RUSSEL, C. Synergism between ultrasonic waves and hydrogen peroxide in killing of microorganisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v.39, n.1, p.31-40, 1975.

AKBAS, M.Y.; OLMEZ, H. Effectiveness of organic acids, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut iceberg lettuce. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, n. 14, p. 2609–2616, 2007.

ALLENDE, A.; McEVOY, J. ; TAO, Y. ; LUO, Y. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypoclorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. **Food Control**, v.20, n.3, p. 230-234, 2008a.

ALLENDE, A.; SELMA, M.V.; LOPÉZ-GALVEZ, F. VILLAECUSA, R.; GIL, M.I. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microrganisms

and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v.49, n.1, p. 155-163, 2008b.

ALLENDE, A. SELMA, M.V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; GIL, M.I. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. **Journal of Food Protection**, v.71, p.2514-2518, 2008c.

ALVARO, J. E.; MORENO, S.; DIANEZ, F.; SANTOS, M.; CARRASCO, G.; URRESTARAZU, M. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. **Journal of Food Engineering,** v.95, p.11-15, 2009.

ARTÉS, F.; ALLENDE, A. **Minimal fresh processing of vegetables, fruits and juices**. In: Emerging Techonologies for Food Processing., Ed. Elsevier, p.677-716, 2005.

ARTÉS, F.; GÓMEZ, P.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V.; ARTÉS-HERNANDEZ, F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, p. 287-296, 2009.

ARTÉS, F.; GÓMEZ, P.A.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. **Food Science and Technololology International,** v.13, n.3, p.177-188, 2006.

ANNOUS, B.A.; SOLOMON, E.B.; COOKE, P.H., BURKE, A.M., UKUKU, D.O.,. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melon. Journal of Food Safety 25:276-287. 2005.

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

ARUSCAVAGE, D.; LEE, K.; MILLER, S.; LEJUNE, J.T. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. **Journal of Food Science**, v.7, n.8, p.89-99, 2006.

BASTOS, M.S.R.; SOARES, N.F.F.; ANDRADE, N.J.; ARRUDA, A.C.; ALVES, R.E. The effect of the association of sanitizers and surfactant in the microbiota of cantaloupe (*Cucumis melo* L.) melon surface. **Food Control**, v.16, p. 369-373, 2005.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CANOVAS, G. Study of butter fat content in milk inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. **Innovative Food Science and Emmerging Technologies,** v.9, p.176-185, 2008.

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

BORDINI, M. E. E.; RISTORI, C.A.; JAKABI, M.; GELLI, D.S. Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. **Food Control**, v.18, p.1002–1007, 2007.

BOTERO, A.E.C.; TOREM, M.L.; MESQUITA, L.M.S. Perspectiva e potencial aplicação de biorreagentes na flotação de minerais. **Revista Escola de Minas**, v. 61, n.1, p.57-61, 2008.

BRANDL, M.T.; MANDRELL, R.E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. **Applied Environmental Microbiology,** v**.** 68, n.7, p. 3614–3621, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51. Dispónível em: <

http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>. Acesso em: 31 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas.** Disponível em: <www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS>. Acesso em: 27 jun. 2009.

BUCK, J.W., WALCOTT, R.R., BEUCHAT, L.R. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. **Plant Health Progress**, 2003.

BURNETT, S.L; BEUCHAT, L.R. Food-borne pathogens: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n.1, p.104-110, 2001.

CAIXETA, D.S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreaks of *Salmonella* serotype Poona infections –United States and Canada. **Morbid Mortal Wkly Rep**, v. 40, p. 459-552, 1991.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Mustistate outbreaks of Salmonella infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants- United States, 2005-2006. **Morbid Mortal Wkly Rep**, v.56, n.35, p.909-911, 2007.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Outbreak of *Salmonella* Serotype Saintpaul Infections Associated with Multiple Raw Produce Items.** Disponível: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5734a1.htm>. Acesso em: 22 jun. 2009.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC, 2001. Disponível em: <www.cdc.gov.> Acesso em: 15 jun. 2009.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections, 2008-2009.** Disponível em: <http://www.cdc.gov.print.dourl=http:%3A//www.cdc.gov/salmonella/typhimurium>. Acesso em: 20 mai. 2009.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak, Utah and New Mexico, 2006**. Disponível: <http://www.cdc.gov/eid/content/14/10/1633.htm?s_cid=eid1633_e>. Acesso em: 23 jun. 2009.

CHIA, W.R.; GOULTER, R.M.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G.A.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 853-859, 2009.

COOLEY, M.B.; MILLER, W.G.; MANDRELL, R.E. Colonization of Arabidopsis thaliana with *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and Competition by *Enterobacter asburiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4915-4926, 2003.

DAS, E., GURAKAN,G. C., BAYINDIRLI, A. Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella* Enteritidis on cherry tomatoes. **Food Microbiology**, v.23, n.5, p.430–438, 2006.

ELLS, T.C.; HANSEN, L.T. Strain and growth temperature influence *Listeria* ssp. attachment to intact and cut cabagge. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, n.1, p. 34-42, 2006.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus*

aureus on fresh, minimally processed vegetables. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p.705-713, 2008.

ERKAN, M.E.; VURAL, A. Investigation of microbial quality of some leafy green vegetables. **Journal of Food Technology**, v. 6, n.6, p. 258-288, 2008.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.2, p. 207-211, 2004.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Ultrasound as pre-treatment for drying of fruits: Dehydration of banana. **Journal of Food Engineering**, v.82, n.2, p. 261-267, 2007.

FIGUEIREDO, H.M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2000.

FLESSA, S.; LUSK, D.M.; HARRIS, L.J. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries, **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n.1, p. 255–262, 2005.

FLOROS, J. D.; LIANG, H. Acoustically assisted difusion through membranes and biomaterials. **Food Technology**, v.48, n.8, n. p.79-84, 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Center of Food Safety and Applied Nutrition. **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing Technologies – Ultrasound**. 02 de junho de 2000. Disponível em: http://www.cfsan.fda.gov/. Acesso em: 20 set. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) (a). **Ensuring Food Safety: Tracking and Resolving the *E.coli* Spinach Outbreak. 2006.** Disponível em <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm110926.htm>. Acesso em: 10 jun. 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) (b)**.** Disponível em <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/EnforcementReports/2007/ucm120448.htm >. Acesso em: 10 jun. 2009.

FRANZ, E.; VISSER, A.A.; van-DIEPENINGEN, A.D.; KLERKS, M.M.; TERMOESHUIZWN, A.J.; van-BRUGGEN, A.H.C. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica serocar Typhimurium. **Food Microbiology**, v.24, n. 1, p. 106-112, 2007.

GARROOD, M.J.; WILSON, P.D.G.; BROCKLEHURST, T.F. Modeling the rate of attachment of *Listeria monocytogenes, Pantoea agglomerans,* and *Pseudomonas fluorescens* to, and the probability of their detachment from, potato tissue at 10 ºC. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p. 3558-3565, 2004.

GIL, M.I.; SELMA, M.V.; LÓPEZ-GALVEZ, F.; ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology,** v. 134, n.1-2, p. 37-45, 2009.

GOGATE, P.R., KABADI, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal** v. 44, n. 1, p. 60-72, 2009.

GUENTZEL, J.L.; LIANG, L.K.; CALLAN, M.A.; EMMONS, S.A.; DUNHAM, V.L. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. **Food Microbiology**, v. 25, n.1, p.:36–41, 2008.

GUERRERO, S.; LÓPEZ-MALO,A.; ALZAMORA, S.M. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. **Innovative Food Science an Emmerging Technologies**, v.2, n. 1, p.31-39, 2001.

GÜNDÜZ, G.T.; GÖNÜL, S.A., KARAPINAR, M. Efficacy of myrtle oil against *Salmonella* Typhimurium on fresh produce. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, n. 2, p.147-150, 2009.

GUPTE, A.R., De REZENDE, C.L.; JOSEPH, S.W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT014. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6669-6675, 2003.

HAN, Y.; SHERMAN, D.M.; LINTON, R.H.; NIELSEN, S.S.; NELSON, P.E. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green peppers surfaces. **Food Microbiology**, v.17, n.,13, p. 521-533, 2000.

HEDBERG, C. W., F. J. ANGULO, K. E. WHITE, C. W. LANGKOP, W. L. SCHELL, M. G. STOBIERSKI, A. SCHUCHAT, J. M. BESSER, S. DIETRICH, L. HELSEL, P. M. GRIFFIN, J. W. McFARLAND, M. T. Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. **Epidemiology and Infection,** v.122, n. 3, p.385–393, 1999.

HOLTZ, S.G. **Aplicação de ozônio e de revestimentos comestíveis em morangos (*Fragaria ananassa* Duch.) minimamente processados.** 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

HORTIBRASIL. Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura. **O negócio de frutas e hortaliças frescas.** Disponível em: <http://www.hortibrasil.org.br/negocio.htm>. Data de Acesso: 20 de maio de 2009.

HUANG, T.S.; XU, C.L.; WALKER, K.; WEST, P.; ZHANG, S.Q.; WEESE, J. Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. **Journal of Food Science,** v.71, n. 4, p. m134-m139, 2006.

IHL, M.; ARAVENA, L.; SCHEUERMANN, E. ; UQUICHE, E.; BIFANI, V. Effect of immersion solutions on shelf-life of minimally processed lettuce, **LWT Food Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 591–599, 2003.

ISLAM, M.; MORGAN, J.; DOYLE, M.P.; PHATAK. S.C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Persistence of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.1, n.1, p.27-35, 2004.

ITURRIAGA, M.H.; TAMPLIN, M.L., ESCARTI´N, E.F. Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.30–34, 2007.

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

JOLIVET-GOUGEON, A.; SAUVAGER, F.; BONNAURE-MALLET, M.; COLWELL, R.R.; CORMIER, M. Virulence of viable but nonculturable *S.* Typhimurium LT2 after peracetic acid treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p. 147-152, 2006.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**. v.64, p. 367–372, 2001.

KIM, H. KANG, Y.; BEUCHAT, L.R.;RYU, J.H. Production and stability of chlorine dioxide in organic acid solutions as affected by pH, type of acid, and concentration of sodium chlorite, and its effectiveness in inactivating *Bacillus cereus* spores. **Food Microbiology**. v.25, p. 964-969, 2008.

KIM, H.; TYU, J.H., BEUCHAT, L.R.; Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its

elimination. **International Journal of Food Microbiology,** v.111, p. 134-143, 2006.

KIM, J.M.; LINTON, R.H. Identification of a non-pathogenic surrogate organism for chlorine dioxide (ClO_2) gas treatment. **Food Microbiology**, v.25, p.597-606, 2008.

KITIS, M. Disenfection of wasterwater with peracetic acid: a review. **Environmental International,** v.30, n.1, p.47-55, 2004.

KROUPITSKI, Y.; PINTO, R.; BRANDL, M. T. ; BELAUSOV, E.; SELA S. Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. v. 106, n°6, pp. 1876-1885 2009,

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n. 9, p.229-233, 2006.

LEE, .S.Y.; BAEK, S.Y. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. **Food Microbiology**, v. 25, n.4, p. 582-587, 2008.

LEE, S.Y.; COSTELLO, M.; KANG, D.H. Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer of lettuce leaves. **Journal of Food Protection**, v. 67, n.6, p. 1371-1376, 2004.

LEE, D.U.; HEINZ, V.; KNORR, D. Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** v.4, n.4, p. 387–393, 2003.

LIMA, P.M. **Influência da microbiota natural e de fatores físico-químicos na adesão de *Salmonella* Enteritidis em alface de cultivo hidropônico e**

convencional. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

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

LÓPEZ-GÓMEZ, V.M.; RAJKOVIC, A.; RAGAERT, P.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. **Trends in Food Science e Technology.** v.20, n.1, p.17-26, 2009.

LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; JIMENEZ-FERNÁNDEZ, M.; ALZAMORA, S.M.; GUERRERO, S. Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n.1-2, p. 87-93, 2005.

McMAHON, M.A.S.; WILSON, I.G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n.1, p. 155–162, 2001.

MACÊDO, J. A. B. **Determinação de triahalometanos em águas de abastecimento público e de indústria de alimentos**. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos]- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1997.

MACÊDO, J.A.B.; ANDRADE, N.J.; ARAÚJO, J.M.A.A.; CHAVES, J.B.P.; SILVA, M.T.C.; JORDÃO, C.P. Quantificação de trihalometanos (THM) em amostras de água pré e póscloradas com hipoclorito de sódio (HPCS) por cromatografia de fase gasosa utilizando-se microextração em fase sólida (MEFS). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 310, p. 22-27, 1999.

MACÊDO, J.A.B.; ANDRADE, N.J.; ARAÚJO, J.M.A.A.; CHAVES, J.B.P.; SILVA, M.T.C.; JORDÃO, C.P. Cloraminas orgânicas uma solução para evitar a formação de trihalometanos no processo de desinfecção de águas para o

abastecimento público. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 90/91, p. 93–103, 2001.

MAHMOUND, B.S.; LINTON, R.H. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on lettuce by chlorine dioxide gas. **Food Microbiology**, v.25, n.2, p.244-252, 2008.

MARTÍN-DIANA, A. B.; RICO, D.; RYAN-BARRY, C. Grean tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, n.4, p. 2008.

MARTINS, A.G. L. de A.; NASCIMENTO, A.R.; SOUSA, A. G.; SERRA, J. L.; FILHO, J.E.M.; OLIVEIRA, F. C. C. Identificação sorológica de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.) cultivado em sistema orgânico e hidropônico. In: **Anais do IV Congresso Latino Americano e X Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 21 a 24 de abril de 2009, Florianópolis, Santa Catarina,** Revista Higiene Alimentar, v. 23, n. 170 e 171, p.453, 2009.

MASON, T.J.; RIERA, E.; VERCET, A.; LOPEZ-BUESA, P. Application of Ultrasound. In: SUN, D.W. **Emerging Technologies for Food Processing**, Elsevier Ltda, p. 232–351, 2005.

McWATTERS, K.H.; HASHIM, I.B.; WALKER, S.L.; DOYLE, M.P.; RIMAL, A.P. Acceptability of lettuce treated with a lactic acid and hydrogen peroxide antibacterial solution, **Journal of Food Safety,** v.25,n. 3, p. 223–242, 2002.

MORRIS, C. E.; MONIER, J. M.; JACQUES, M. A. Methods for observing microbial biofims directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.4, p.1570-1576, 1997.

MUNKACSI, F.; ELHAMI, M. Effect of ultrasonic and ultraviolet irradiation on chemical and bacteriological quality of milk. **Egyptian Journal of Dairy Science**, v.4, n.1, p.1-6, 1976.

NASCIMENTO, L. C.; LIMA, L. C. O. ; PICOLLI, R. H.; FIORINI, J. E. ; DUARTE, S. M. S.; SILVA, J. M. S. F.; OLIVEIRA, N. M. S.; VEIGA, S. M. O. M.. Ozônio e ultrassom: processos alternativos para o tratamento do café despolpado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, p.282-294, 2008.

NGUZ, K.; SHINDANO, J.; SAMAPUNDO, S.; HUYGHEBAERT, A. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia, **Food Control**, v**.** 16, n.1, p. 623–628, 2005.

OIE, S.; KIYONAGA, H., MATSUZAKA, Y.; MAEDA, K.; MASUDA, Y., TASAKA, K., ARITOMI, S., YAMASHITA, A.; KAMIYA, A. Microbial contamination of fruit and vegetables and their disinfection. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.31, n. 10, p.1902-1905, 2008.

OLIVEIRA, A. M. C., **Estudo das características físico-químicas e microbiológicas de abacaxi (*Ananas comosus*), goiaba (*Psidium guajava* L.) e maracujá (*P. edulis* L.) minimamente processados**. 120f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

OLIVEIRA, K.M.P. **Adesão de *Salmonella* Enteritidis em superfícies de processamento de alimentos.** 107f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

OLIVEIRA, A M C.; COSTA, J. M. C. da; MAIA, G. A. Qualidade higiênico-sanitária de abacaxi 'pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira Promoção da Saúde**, v. 19, n. 1, p. 19-24, 2006.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **Food Science and Technology,** v. 42, n. 3, p.686-693, 2009.

ONGENG, D.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; COOSEMANS, J. RYCKEBOER, J. The efficacy of electrolysed oxidising water for inactivating spoilage microrganisms in process water and on minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p.187-197, 2006.

OULAHAL., N. MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M. BLUM, L.J. Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/ or a chelating agent. **Innovative Food Science and Emmerging Technologies**. v. 8, n. 2, p.192-196, 2007.

PAGAN, R.; MANAS, P.; ALVAREZ, L.; CONDON, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sub-lethal temperatures. **Food Microbiology**, v. 16, n. 2, p.139-149, 1999.

PARK, C. M.; BEUCHAT, L. R. Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v. 19, n. 1, p. 842-847, 1999.

PARK, E.J.; ALEXANDER, E.; TAYLOR, G.A.; COSTA, R.; KANG, D.H. The decontaminative effects of acidic electrolyzed water for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on green onions and tomatoes with differing organic demands. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 386-390, 2009.

PARNELL, T.L.; HARRIS, L.J.; SUSLOW, T.V. Reducing *Salmonella* on cantaloupes and honeydew melons using practices applicable to postharvest handling, foodservice, and consumer preparation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 59-70, 2005.

PARISH, M.E.; BEUCHAT, L.R.; SUSLOW, T.V.; HARRIS, L.J.; GARRET, E.H.; FARBER, J.N.; BUSTA, F.F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2 (Supplemento), p.161-171, 2003.

PAVÓN, J. L. P.; MARTÍN, S. H.; PINTO, C. G.; CORDER, B. M. Determination of trihalomethanes in water samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.629, n.1-2, p. 6-23, 2008.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A.P.S.; Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p. 887-893, 2008.

PINTO, D. M. Qualidade de produtos minimamente processados comercializados em diferentes épocas do ano. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; McKELLAR, R.C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 207-216, 2003.

PRADO, M. E. T.; CHITARRA, A. B., BONNAS, D. S., PINHEIRO A. C. M., MATTOS, L. M. Armazenamento de abacaxi "smooth cayenne" minimamente processado sob refrigeração e atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p.67-70, 2003.

RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; LOOS, S.; DEWULF, J.; Van LANGENHOVE, H.; Foubert, I.; VANROLLEGHEM, P.A.; DEBEVERE, J. Role of yeast proliferation in the quality degradation of strawberries during refrigerated storage**. International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p.42-50, 2006.

RAYNER, J.; VEEH, R.; FLOOD, J. Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 1, p.29-39, 2004.

REINA, L.D.; FLEMING, H.P.; BREIDT Jr., F. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1881-1887, 2002.

RICO, D. ; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C.; FRIAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M.; BARAT, J. M. Use of neutral electrolysed water (EW) for quality maintence and shelf life extension of minimally processed lettuce. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 37-48, 2008.

RICO, D. ; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science and Technology,** v.18, n.7, p.373-386, 2007.

RODGERS, S.L.; CASH, J.N.; SIDDIQ, M.; RYSER, E.T. A comparasion of different chemical sanitizers for inactivating, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v. 67, n.4, p.721-731, 2004.

RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N.; TAGLIARI, V.Z.; OLIVEIRA, A.P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S.C.; TAGLIETI, R.M.; DICKEL, E.L.; NASCIMENTO, V.P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n. 3, p. 225-230, 2009.

ROSA, C.; SAPATA, M.; GUERRA, M. M. Chemical and sensory characteristics and microbiological safety of fresh finely chopped parsley packed in modified atmosphere. **Food Control**, v.18, n.8, p.1008-1012, 2006.

ROSSINI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless food processing surfaces using

epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p.81-85, 2000.

RUÍZ-CRUZ, S.; FÉLIX, E. A.; CINCO, M. D. ; OSUNA, M. A. I.; AGUILAR, G. A. G. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. **Food Control,** v. 18, n. 11, p.1383-1390, 2007.

SAN MARTÍN, M.F.; HARTE, F.M.; LELIEVELD, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; SWANSON, B.G. Inactivation effect of 18 pulsed magnetic field combined with another technologies on *Escherichia coli*. **Innovative Food Science and Emmerging Technologies**, v. 2, n.1, p. 273-277, 2001.

SAPERS, G. M. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 305-311, 2000.

SAPERS, G. M.; MILLER, R.L.; PILIZOTA, V. MATTRAZZO, A.M. Antimicrobial treatments for minimally processed cantaloupe melon. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 2, p. 345-349, 2001.

SCOUTEN, A. J.; BEUCHAT, L. R. Combined effects of chemical and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.4, p.668-674, 2002.

SELMA, M.V.; IBANEZA, A. M.; ALLENDE, A.; CANTWELLA, M.; SUSLOW, T. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. **Food Microbiology**, v. 25, n.1, p.162-168, 2008.

SEO, K.H.; FRANK, J.F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Protection**, v.62, n. 1, p. 3–9, 1999.

SEYMOUR, I. J. ; BURFOOT, D.; SMITH, R. L.; COX, L. A.; LOCKWOOD, A. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n.1, p. 547-557, 2002.

SHINOHARA, N.K.S.; V.B.B.; JIMENEZ, S. M.C.; MACHADO, E.C. L; DUTRA, R. A.F.; FILHO, J.L.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, vol. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

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

SILVA, E. O. ; BASTOS, M. S. R.; ALVES, R. E.; SOARES, N. F. F.; PUSCHMANN, R. Segurança microbiológica em frutas e hortaliças minimamente processadas. In: I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, Brazil, p. 37-46, abril 2006.

SILVA, G. C. **Estudo do efeito do tipo de corte, adição de cloreto de cálcio e ácido ascórbico nas características físicas, físico-químicas e microbiológicas do abacaxi minimamente processado**.120f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

SINGH, N.; SINGH, R.K.; BHUNIA, A.K. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfafa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. **Lebensmittel-Wissenschaff und- Technologie**, v.36, n.2, p.235-243, 2003.

SOLOMON, E.B.; MATTHEWS, K.R. Interaction of live and dead Escherichia coli O157:H7 and fluorescent microspheres with lettuce tissue suggests bacterial processes do not mediate adherence, **Letters in Applied Microbiology**, v.42, n.2, p. 88–93, 2006.

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

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; MIJAC, V.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v.20, n.3, p.339–343, 2003.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters of Applied Microbiology**, v.38,n.5, p.428–432, 2004.

SREBERNICH, S.M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos ao hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.27. n. 4, p.744-750, 2007.

SY, K.V.; McWATTERS, K.H.; BEUCHAT, L.R. Efficacy of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella,* yeasts, and moulds on blueberries, strawberries, and raspberries. **Journal of Food Protection**, v.68, n.6, p.1165-1175, 2005.

SZABO, E.; SCURRAH, K.; Borrows, J. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Letters of Applied Microbiology**, v. 30, n.1, p. 456–460, 2000.

TAYLOR, J.H.; ROGERS, S.J.; ITOLAH, J.T. A comparison of the bactericidal efficacy of a disinfectant used in food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 °C. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, n.7, p.18-25, 1998.

TOURNAS, V.H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n.1, p.71-77, 2005.

TRIGO, M. J., SOUSA, M. B., SAPATA, M. M., FERREIRA, A., CURADO, T., ANDRADA, L. BOTELHO, M. L., VELOSO, M.G. Radiation processing of minimally processed vegetables and aromatic plants. **Radiation Physics and Chemistry,** v.78, n.7-8, p.659–663, 2009.

WALKING-RIBEIRO, M.; NOCI, F.; RIENER, J.; CRONIN, D.A.; LYNG, J.G.; MORGAN, D.J. The impact of thermosonication and pulsed electric fields on *Staphylococcus aureus* inactivation and selected quality parameters in orange juice. **Food Bioprocess Technology**, v. 2, n. 4, p. 213-221, 2007.

UKUKU, D.O. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp**. International Journal of Food Microbiology**, v.95, n.2, p.137-146, 2004.

UKUKU, D.O. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. **Food Microbiology**, v.23, n.3, p.289-293, 2006.

UKUKU, D.O.; SAPERS, G.M. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella stanley* attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. **Journal of Food Protection.** v.64, n.9, p. 1286–1291, 2001.

UKUKU, D.O.; SAPERS, G.M. Effect of time before storage and storage temperature on survival of *Salmonella* inoculated on fresh-cut melons. **Food Microbiology**, v.24, n.3, p.288-295, 2007.

VALERO, M.; RECROSIO, N.; SAURA, D. ; MUÑOZ, N.; MARTÝ, N.; LIZAMA, V. Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n.2, p.509–516, 2007.

VANDEKINDEREN, I.. CAMP, J.V.; DEVILIEGHERE, F.; VERAMME, K.; DENON, Q.; RAGAERT, P.; De MEULENAER, B. Effect of decontamination agents on the microbial population, sensory quality, and nutrient content of

grated carrots (*Daucus carota* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.5723-5731, 2008.

VANDEKINDEREN, I.; DEVILIEGHERE, F.; CAMP, J.V.; KERKAERT, B.; CUCU, T.; RAGAERT, P. Effects of food composition on inactivation of foodborne microorganisms by chlorine dioxide. **International Journal of Food Microbiology**. v.131, p.138-144, 2009.

VELÁZQUEZ, L.D.C.; BARBINI, N.B.; ESCUDERO, M.E.; ESTRADA, C.L. Evaluation of chlorine, benzalkonioum chloride and lactic acid as sanitizers for reducing Escherichia coli O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. **Food Control**, v.20, p.262-269, 2009.

VEIGA, S. M.O.M. **Sanificação de carcaças de frango: processos alternativos**. 291f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003.

VILLAMIEL, M.; VAN HAMERVSVELD, E.H., DE JONG, P. Review: Effect of ultrasound processing on quality of dairy products. **Milk Science International**, v.54, n.2, p. 69-73, 1999.

VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; GALLO, C. R., MORETTI, C. L. ; JACOMINO, A. P. Efeito do momento de sanitização sobre os atributos físico-químicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.4, p. 718-721, 2004.

WU, V.C.H.; KIM, B. Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeasts and moulds on blueberries. **Food Microbiology**, v.24, n.7-8, p.794-800, 2007.

XU, W.; QU, W.;HUANG, K., GUO, F.; YANG, J.; ZHAO, H.; LUO, Y. Antibacterial effect of Grapefruit Seed Extract of foodborne pathogens and its application in preservation of minimally processed vegetables. **Postharverst Biology and Technology**, v.45, n.1, p. 123-6-133, 2007.

ZENKER, M.; HEINZ, V.; KNORR, D. Application of ultrasound assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1642-1649, 2003.

7. APÊNDICES

Apêndice A - Análise de variância para redução da contagem inicial de mesófilos aeróbios de agrião minimamente processado submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	133,9698636	13,3969864	26,99*
Erro	33	16,3813250	0,4964038	
Total	43	150,351186		

Coeficiente de variação = 29, 49910

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice B - Análise de variância para redução da contagem inicial de fungos filamentosos e leveduras de agrião minimamente processado submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	25,52860455	2,552860455	6,40*
Erro	33	13,16275000	0,39887121	
Total	43	38,69135455		

Coeficiente de variação =39,39432

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice C - Análise de variância para redução da contagem inicial de mesófilos aeróbios de morango processado submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	50,35142273	5,03514227	14,26*
Erro	33	11,65367500	0,35301364	
Total	43	62,00509773		

Coeficiente de variação = 29,06226

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice D - Análise de variância para redução da contagem inicial de fungos filamentosos e leveduras de morango minimamente processado submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	36,01162273	3,601162273	10,20*
Erro	33	11,64945000	0,35301364	
Total	43	47,66107273		

Coeficiente de variação = 34,20013

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice E - Análise de variância para redução da contagem inicial de mesófilos aeróbios de salsa minimamente processada submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	125,2255182	12,52255182	19,64*
Erro	33	21,0371250	0,6374886	
Total	43	146,2626432		

Coeficiente de variação = 35,62607

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice F - Análise de variância para redução da contagem inicial de fungos filamentosos e leveduras de salsa minimamente processada submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	55,077836818	5,5077836818	14,07*
Erro	33	12,91365000	0,39132273	
Total	43	67,99201818		

Coeficiente de variação = 29,31886

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice G - Análise de variância para redução da contagem inicial de mesófilos aeróbios de tomate cereja minimamente processado submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	58,486659091	5,8486659091	9,25*
Erro	33	20,86612500	0,63230682	
Total	43	79,35271591		

Coeficiente de variação = 41,58778

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice H - Análise de variância para redução da contagem inicial de fungos filamentosos e leveduras de tomate cereja minimamente processado submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	25,178041091	2,5178041091	5,02*
Erro	33	16,53687500	0,50111742	
Total	43	41,71491591		

Coeficiente de variação = 37,81406

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice I - Análise de variância para redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 inoculada em tomate cereja submetido a diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	6	33,80149524	3,380149524	10,58*
Erro	14	7,45380000	0,53241429	
Total	20	41,25529524		

Coeficiente de variação = 11,95429

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice J - Análise de variância dos valores de pH de agrião minimamente processado após os tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	11	7,23095625	0,65735966	10,98*
Erro	36	2,15582500	0,05988403	
Total	47	9,38678125		

Coeficiente de variação = 3,956942

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice K - Análise de variância dos valores de pH de morango minimamente processado após os tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	11	4,1587292	0,41053390	25,89*
Erro	36	0,57092500	0,00158903	
Total	47			
Coeficiente de variação = 3,937189				

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice L - Análise de variância dos valores de pH de salsa minimamente processada após os tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	11	2,65250625	0,24113693	7,92*
Erro	36	1,09667500	0,03046319	
Total	47			
Coeficiente de variação = 2,946084				

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice M - Análise de variância dos valores de pH de tomate cereja após os tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL) soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F (F).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	11	1,09117292	0,09919754	2,2^{NS}
Erro	36	1,62012500	0,04500347	
Total	47	2,71129792		

Coeficiente de variação = 5,361872

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{NS} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.