

**WANESSA ALTIMIRAS COSTA**

**CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM COUVE (*Brassica oleraceae*  
*cv. acephala*) MINIMAMENTE PROCESSADA**

Tese 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  
2002**

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

T

C837c  
2002

Costa, Wanessa Altimiras, 1972-

Controle de *Listeria monocytogenes* em couve  
(*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) minimamente proces-  
sada / Wanessa Altimiras Costa. – Viçosa : UFV, 2002.  
56 p. : il.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Viçosa

1. Couve - Microbiologia. 2. Couve - Processamento  
mínimo - Sanitização. 3. *Listeria monocytogenes* - Contro-  
le. 4. Bactérias produtoras de ácido láctico. 5. Microbio-  
logia sanitária. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 576.163

CDD 20.ed. 576.163

**WANESSA ALTIMIRAS COSTA**

**CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM COUVE (*Brassica oleraceae*  
*cv. acephala*) MINIMAMENTE PROCESSADA**

Tese 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: 13 de agosto de 2002

---

Prof. Rolf Puschmann  
(Conselheiro)

---

Prof. Nélio José de Andrade  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>ª</sup> Nilda de Fátima Ferreira Soares

---

Prof<sup>ª</sup> Míriam Teresinha dos Santos

---

Prof<sup>ª</sup> Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

“NÃO SE TRATA DE DESCOBRIR E PERCORRER SOZINHO UMA  
ÚNICA VEZ UMA PISTA. MAS DE TRAÇAR E DE CONCLUIR, PARA  
USO DE MUITOS, UMA LARGA PISTA”.

(LEBRET)

Dedico aos meus pais, Antônio  
Carlos e Maria Lêda, pelo amor e  
carinho sempre a mim dados de uma  
forma incondicional e imensurável.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, presença, apoio e estímulo a mim dispensados.

Ao Professor Rolf Puschmann, pela concessão do laboratório, pela presença, pelas consideráveis correções e sugestões à dissertação e pela credibilidade a mim manifestada.

Aos Professores, Nélio José de Andrade, Míriam Teresinha dos Santos, Nilda de Fátima Ferreira Soares e Rolf Puschmann, membros da banca, pelas oportunas considerações e sugestões.

À Professora Célia Alencar de Moraes, pela concessão do laboratório e pelas valiosas sugestões.

Ao Adão Siqueira Ferreira, pela ajuda e paciência na realização das análises estatísticas.

À Débora Castellani, por ter-me disponibilizado o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis*.

Às “meninas” da secretária do Departamento de Microbiologia, Nilcéa, Laura e D<sup>a</sup> Aparecida, pela competência, simpatia, e pelos tratamentos e atendimentos “vips”.

Aos funcionários Antônio, Cesário, Danilo e Evandro, pela simpatia e por disponibilizar mais rapidamente o material de trabalho.

Aos meus pais, irmãos, tios e avós que mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram muito ligados a mim, dando-me força, apoio e conforto.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia de Pós-Colheita e Microbiologia Industrial, pela colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, ajuda, pelas descontrações e “implicâncias musicais” que só fizeram com que ficássemos mais unidos.

Ao estagiário Uelinton “José”, por ajudar nas titulações e filtrações noturnas.

À família republicana, Edgard, Ana Paula, Klédna, Marcos, Francismar e Poliana, pela amizade, excelente convivência e por ajudar a amenizar o “stress básico do dia a dia”.

Às criaturinhas Marciana, Selma, Rachel, Elizângela, Eliseth, Samantha, Anne, Grace, Ana Lúcia, Cláudia Lúcia, André, Juliana, Edgard, Ana Paula, Klédna, Marcos, Francismar, Poliana, Míriam, ... pessoas inesquecíveis, agradeço pela amizade, força, presença, festas, ..., por tudo.

A todos aqueles colegas, amigos, professores e funcionários que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Wanessa Altimiras Costa, filha de Antônio Carlos Costa e Maria Lêda Altimiras Costa, nasceu em 15 de novembro de 1972, em Cordisburgo-MG.

Concluiu o 2<sup>o</sup> grau no Colégio Nossa Senhora das Dores, em Diamantina – MG.

Em 1995, ingressou no Curso de Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Uberlândia, com habilitação em Licenciatura Plena e Bacharelado, graduando-se em setembro de 1999.

Em fevereiro de 2000, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos, defendendo tese em 13 de agosto de 2002.

## ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Matéria-prima.....	18
3.2. Processamento mínimo.....	18
3.3. Determinação das condições de sanitização.....	20
3.3.1. Avaliação do tempo de sanitização.....	20
3.3.2. Avaliação da efetividade de sanitizantes.....	20
3.4. Seleção de bactéria láctica com atividade antilisterica.....	22
3.5. Avaliação do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em couve minimamente processada na presença ou não da bactéria láctica selecionada.....	23
3.5.1. Preparação dos inóculos de <i>L. monocytogenes</i> e da bactéria láctica....	24
3.5.2. Inoculação de <i>L. monocytogenes</i> e da bactéria láctica selecionada em couve minimamente processada.....	24
3.6. Análises microbiológicas de couve minimamente processada.....	25
3.7. Determinação da acidez titulável em couve minimamente processada.....	26
3.8. Análises estatísticas.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28

4.1. Condições de sanitização da couve.....	28
4.1.1. Tempo de sanitização.....	28
4.1.2. Efetividade dos sanitizantes.....	30
4.2. Bactéria láctica selecionada com atividade antilistérica.....	32
4.3. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em couve minimamente processada na presença ou não da bactéria láctica com atividade antilistérica.....	35
4.4. Contagens de bactérias lácticas e psicrotróficas aeróbias em amostras de couve minimamente processada estocadas a 5, 10 e 15°C.....	40
4.5. Acidez titulável em couve minimamente processada .....	44
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## RESUMO

COSTA, Wanessa Altimiras MS., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2002.  
**Controle de *Listeria monocytogenes* em couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) minimamente processada.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Rolf Puschmann e Nélio José de Andrade.

Analisou-se o efeito do tempo de sanitização para a redução do número de mesófilos aeróbios e dos sanitizantes clorado orgânico, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, prata coloidal e extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* para a redução do número da microbiota contaminante e de *Listeria monocytogenes* em couve minimamente processada. Após 10 minutos de sanitização da couve com clorado orgânico adicionado ou não de 1% de ácido láctico, o número de mesófilos aeróbios contaminantes foi reduzido em, no máximo, 2 ciclos logarítmicos. O aumento do tempo de tratamento para 20 ou 30 minutos não resultou em diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na redução do número de contaminantes. A sanitização da couve por 10 minutos, em soluções com ácido peracético e peróxido de hidrogênio reduziu, significativamente ( $P < 0,05$ ), o número de mesófilos aeróbios em torno de 1,9 e 1,5 ciclos logarítmicos, respectivamente,. A redução da população de *L. monocytogenes*, inoculada na proporção de  $10^6$  UFC por grama de couve, não foi significativamente diferente quando clorado orgânico, ácido peracético, peróxido de hidrogênio e extrato hidroalcolico de *S. officinalis* foram usados. A avaliação do potencial inibidor de bactérias lácticas sobre *L. monocytogenes* “in vitro”, mostrou

que o isolado da couve denominado CCA3, foi capaz de crescer melhor em caldo MRS a 5, 10 e 15°C e apresentar maior halo de inibição do crescimento desse patógeno em ágar a 10 e 15°C. Esse isolado foi selecionado para ser avaliado quanto ao potencial como bioconservante em couve minimamente processada, para controlar o crescimento de *L. monocytogenes* inoculada no produto. *L. monocytogenes* foi capaz de crescer em couve minimamente processada acondicionada em embalagens de poliolefina multicamada, com a modificação passiva da atmosfera e armazenada a 5, 10 e 15°C. A inoculação de, aproximadamente,  $10^8$  UFCg<sup>-1</sup> do isolado CCA3 no produto não promoveu a inibição do crescimento de *L. monocytogenes* a 5 e 10°C, uma vez que a população desse patógeno aumentou em torno de 2,8 ciclos logarítmicos. No entanto, a 15°C, em condições de abuso de temperatura, a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) de *L. monocytogenes* foi significativamente menor na presença do isolado CCA3. A população de bactérias produtoras de ácido manteve-se até o vigésimo dia, em torno de  $10^7$  a  $10^8$  UFCg<sup>-1</sup> nos tratamentos onde a couve foi inoculada com o isolado CCA3. Nas amostras não inoculadas, o aumento observado foi em torno de 1,8 a 4,5 ciclos logarítmicos. A população de psicrotróficos aeróbios aumentou na couve minimamente processada armazenada a 5°C de 3,4 a 4,6 ciclos logarítmicos e a 10°C, de 4,5 a 5,3 ciclos logarítmicos após 20 dias. Nos produtos armazenados a 15°C por oito dias, o aumento dessa população foi de 3,4 a 5,7 ciclos logarítmicos. A inoculação da couve minimamente processada com um número elevado de células de CCA3 não alterou a acidez titulável nem as características visuais do produto no período de vida útil.

## ABSTRACT

COSTA, Wanessa Altimiras MS., Universidade Federal de Viçosa, August, 2002.  
**Control of *Listeria monocytogenes* in kale (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*)  
minimally processed.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee  
Members: Rolf Puschmann and Nélio José de Andrade

The effect of the sanitization period on the decrease of number of aerobic mesophiles and of sanitizers organic chlorine, peracetic acid, hydrogen peroxide, colloidal silver and *Salvia officinalis* hydroalcoholic extract to decrease the number of *Listeria monocytogenes* and of the microbial contamination of minimally processed kale was examined. After 10 min of organic chlorine sanitization with or without lactic acid 1%, the number of contaminant aerobic mesophiles was reduced to, at most, 2 logarithmic cycles. The increase of the treatment periods to 20 or 30 minutes did not lead to a significant difference ( $P > 0.05$ ) in the reduction of the contaminants. Kale sanitization in peracetic acid and hydrogen peroxide solutions for 10 min, resulted in significant reductions ( $P < 0.05$ ) around from 1.9 and 1.5 logarithmic cycles, respectively, in the number of aerobic mesophiles. The decrease in *L. monocytogenes* population, inoculated at  $10^6$  CFU per kale gram, was not significantly different whether organic chlorine, peracetic acid, hydrogen peroxide or *S. officinalis* hydroalcoholic extract were used. Evaluation of the inhibition potential of lactic bacteria isolate on *L. monocytogenes* showed that CCA3 isolate were able to grow in the MRS medium at 5, 10 and  $15^{\circ}\text{C}$  and it also exhibited the largest growth

inhibition halo of this pathogen in agar at 10 and 15°C. This isolate was chosen to be evaluated as a potential bioconservative for minimally processed kale, aiming the growth control of *L. monocytogenes* inoculated in the product. *L. monocytogenes* showed the ability to grow in minimally processed kale packed with multilayer polyolefin bags, with passive modification of the atmosphere and stored at 5, 10 and 15°C. Inoculation of about  $10^8$  CFUg<sup>-1</sup> of CCA3 isolate in the product did not lead to growth inhibition of *L. monocytogenes* and, either at 5 or 10°C, the pathogen population increased about 2.8 logarithmic cycles. At 15°C, however, under temperature abusive conditions, the growth specific speed ( $\mu$ ) of *L. monocytogenes* was significantly smaller in the presence of CCA3 isolate. The acid producer bacteria population was kept at about  $10^7$  to  $10^8$  CFUg<sup>-1</sup> in the treatments in which kale was inoculated with CCA3 isolate and, in non-inoculated samples, an increase around of 1.8 to 4.2 logarithmic cycles was observed. The aerobic psychrotrophic population increased in the minimally processed kale and stored at 5°C from 3.4 to 4.6 logarithmic cycles and at 10°C, from 4.5 to 5.3 logarithmic cycles, after 20 days. In the products stored at 15°C for eight days, the population increase was of 3.4 to 5.7 logarithmic cycles. The inoculation of minimally processed kale with an elevated number of CCA3 cells did not altered titratable acidity or the product sensorial characteristics in the shelf life period.

## **1. INTRODUÇÃO**

No Brasil, a produção agrícola se estende a praticamente todos os itens essenciais à alimentação. No entanto, há grandes perdas quantitativas, qualitativas e nutricionais, em razão de práticas inadequadas no manuseio após a colheita, no transporte e no armazenamento dos produtos agrícolas. A técnica de processamento mínimo de hortaliças é, relativamente recente, e busca reduzir os desperdícios desses produtos, favorecendo a economia de alimentos no país e contribuindo também, para melhorar a qualidade e estender a vida de prateleira dos mesmos.

Os produtos minimamente processados vêm apresentando uma grande participação no mercado de produtos frescos e um dos motivos para o aumento dessa demanda é a busca por praticidade, pois é um alimento pronto para o consumo. Mudanças de hábitos dos consumidores modernos, associados a fatores tais como preocupação com a saúde, levando ao consumo de alimentos mais saudáveis, frescos e de boa qualidade; maior número de pessoas morando sozinhas; crescimento do segmento de refeições coletivas no país e menor tempo disponível para o preparo das refeições em razão do aumento da participação feminina no mercado de trabalho, também contribuem para o aumento dessa demanda. Os alimentos minimamente processados passam por etapas durante o processamento tais como classificação, lavagem, sanitização, corte, enxágue, centrifugação, embalagem e armazenamento sob refrigeração para garantir segurança, qualidade e frescor.

Como conseqüência dessa demanda, há necessidade de estabelecimento de condições que possam garantir uma maior vida útil aos alimentos minimamente

processados, com manutenção da qualidade sensorial, nutricional e microbiológica. No entanto, o armazenamento por longos períodos, pode favorecer o crescimento de microrganismos psicrotóxicos, anaeróbios facultativos, deterioradores e, principalmente, patogênicos que não são inibidos por medidas de conservação tais como atmosfera modificada e baixas temperaturas. Métodos alternativos devem ser considerados para garantir a segurança microbiológica desses alimentos prontos para o consumo, principalmente por serem ingeridos, na grande maioria das vezes, crus.

Este estudo foi parte integrante de um projeto multidisciplinar e interinstitucional que objetiva o desenvolvimento da tecnologia de processamento mínimo de hortaliças, sendo enfocados aspectos tecnológicos, microbiológicos, fisiológicos e sensoriais. O objetivo foi avaliar o efeito de fatores inerentes ao processamento mínimo da couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*), tais como tempo de sanitização e tipos de sanitizantes, temperatura e tempo de estocagem e adicionar bioconservante para o controle de *Listeria monocytogenes* inoculada no produto.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A produção de hortaliças frescas minimamente processadas iniciou-se há cerca de trinta anos nos Estados Unidos, sendo amplamente destinada à indústria de “fast-food” (NGUYEN-THE e CARLIN, 1994). No Brasil, a utilização desses produtos começou no princípio da década de 90 (CENCI, 2000). SAABOR (2001) estimou um volume de produtos minimamente processados comercializados em São Paulo, em toneladas por ano, de 2.500 de legumes e verduras e 4.000 de frutas e constatou que a principal razão de consumo dos alimentos minimamente processados (69% dos entrevistados) foi pela praticidade.

A expansão da comercialização dos alimentos minimamente processados pode ser também atribuída ao aumento da conscientização sobre a necessidade de se incluir alimentos vegetais frescos na dieta e à falta de tempo para o preparo das refeições, principalmente devido ao crescimento da participação da mulher no mercado de trabalho. Segundo dados do IBGE, a população feminina economicamente ativa representava 23% em 1971 e passou a representar 40% em 1998 (de SOUZA, 2000). Acrescenta-se ainda o aumento do poder de compra dos consumidores, que buscam alimentos com características de um produto “in natura”, com manutenção da qualidade (ROSA et al., 1999). Segundo dados das maiores redes de supermercados paulistas, 86% dos consumidores de frutas e hortaliças minimamente processadas são mulheres, têm idade média de 39 anos, possuem renda

mensal de 16 salários mínimos e 44% possuem segundo grau ou curso superior (MORETTI, 2001).

Os produtos minimamente processados são geralmente reconhecidos como alimentos submetidos a pequenas modificações das condições naturais, mas que ainda possuem características de produtos frescos (WILEY, 1994). As etapas de processamento mínimo podem promover uma pequena alteração na contaminação microbiana do produto e, geralmente, a microbiota desses produtos consiste de espécies de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, enquanto fungos podem estar presentes em números relativamente baixos. NGUYEN-THE e CARLIN (1994) apresentaram dados referentes ao número de microrganismos encontrados em diferentes trabalhos em amostras de hortaliças frescas minimamente processadas e concluíram que a contagem de bactérias mesófilas em ágar padrão ou meio equivalente, variou de  $10^3$  a  $10^9$  UFCg<sup>-1</sup>, dependendo do local de amostragem e do tempo decorrido até a análise. As contagens de bactérias lácticas, sob condições de anaerobiose, alcançaram  $10^9$  UFCg<sup>-1</sup> em alguns casos. Coliformes em meio seletivo representaram uma pequena parcela dos contaminantes bacterianos, enquanto que coliformes fecais não foram detectados na maioria das amostras estudadas. Leveduras e fungos filamentosos foram, em geral, menos numerosos que as bactérias mesófilas ou lácticas. Dados semelhantes foram obtidos por BITTENCOURT (2000) em couve minimamente processada, acondicionada em embalagens de poliolefina multicamadas 21 µm de espessura e permeabilidade à oxigênio de 9.745 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> e à dióxido de carbono de 28.766 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>. Nessas amostras, coliformes fecais não foram detectados; a contagem padrão de mesófilos aeróbios inicial foi, em média,  $10^4$  UFCg<sup>-1</sup> e variou durante o período de estocagem alcançando valores entre  $10^8$  e  $10^9$  UFCg<sup>-1</sup>. Bactérias anaeróbias e lácticas foram as que apresentaram um maior incremento na população, aumentando em até seis ciclos logarítmicos ao final de 15 dias a 10°C. Entretanto, os psicrotróficos constituíram a microbiota predominante em estocagem a 1, 5 e 10°C.

Uma das principais preocupações com os alimentos minimamente processados embalados sob atmosfera modificada é em relação a bactérias patogênicas capazes de crescer em temperatura de refrigeração (FARBER, 1991), principalmente devido ao fato de que a maioria desses alimentos é consumida sem

nenhum tratamento térmico (NGUYEN-THE e CARLIN, 1994). Dentre os patógenos, destacam-se *Aeromonas hydrophila*, estirpes não-proteolíticas de *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, algumas estirpes de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Vibrio parahaemolyticus* (FARBER, 1991; MARTH, 1998). A intensificação do uso de métodos de preservação de alimentos por refrigeração e a baixa tensão de oxigênio proporciona oportunidades para o crescimento de espécies psicrotróficas anaeróbias facultativas (THOMAS e O'BEIRNE, 2000).

A contaminação de frutas e hortaliças por microrganismos patogênicos tais como bactérias, vírus ou parasitas, pode ser atribuída, inicialmente, à presença de microrganismos na água utilizada para irrigação, no solo, fezes de animais e presença de insetos. Prossegue durante as etapas de colheita, manuseio e transporte da matéria-prima até a indústria e finaliza no preparo do produto pelo consumidor (BEUCHAT, 1995).

*L. monocytogenes* é um patógeno psicrotrófico em forma de bastonete, Gram-positivo, ubíquo na natureza e pode ser encontrado como residente transiente no trato intestinal de humanos e animais e contaminando alimentos como peixes, carnes, leite, hortaliças, entre outros. Além disso, pode sobreviver e crescer em linhas e ambiente de produção de alimentos, especialmente em equipamentos e áreas difíceis de serem limpas. Esse patógeno é capaz de crescer em uma grande faixa de temperatura de 1 a 45°C e em valores de pH de 6 a 9. Não forma cápsula nem esporo; a motilidade é por meio de poucos flagelos peritríquios, quando em temperatura de 20 a 25°C (SNEATH, 1986; NORRUNG, 2000).

*L. monocytogenes* é uma bactéria patogênica que pode causar sérias doenças em humanos, como septicemia e meningite. Embora listeriose ocorra com baixa frequência, a uma taxa inferior a 10 casos por milhão (NORRUNG, 2000) em geral, a taxa de mortalidade estende de 20 a 30% em indivíduos imunodeprimidos (GELLIN e BROOME, 1989). A mortalidade em humanos causada por *L. monocytogenes* é muito maior do que a causada por outros patógenos de origem alimentar, tais como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* e *Campylobacter* (CHOI et al., 2001).

*L. monocytogenes* sobrevive e, ou cresce em produtos minimamente processados, mantidos sob refrigeração (CARLIN et al., 1995; NORRUNG, 2000) e a incidência desse patógeno em hortaliças minimamente processadas varia, normalmente, de 0 a 19% (CARLIN et al., 1995; NGUYEN-THE e CARLIN, 1994; ODUMERU et al., 1997). A incidência de *L. monocytogenes* em alimentos minimamente processados e a alta taxa de mortalidade por listeriose fizeram dessa bactéria um problema importante a ser considerado quando da avaliação dos riscos microbiológicos nesses produtos (NORRUNG et al., 1999).

Baseado em informação epidemiológica de vários países, uma concentração de *L. monocytogenes* não excedendo 100 UFCg<sup>-1</sup> de alimento no ponto de consumo, é de baixo risco para os consumidores (NORRUNG, 2000). No entanto, os Estados Unidos e a Itália, exigem ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de alimento (NORRUNG, 2000). No Brasil, segundo a Resolução número 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, é exigida a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de queijo, não havendo referência alguma para outros tipos de alimentos.

O potencial para sobrevivência e crescimento de *Listeria* em hortaliças minimamente processadas depende do tipo de hortaliça, idade do produto, níveis de contaminação pelo patógeno, procedimento adotado no processamento, temperatura e atmosfera de armazenamento (CARLIN e NGUYEN-THE, 1994; CARLIN et al., 1995; THOMAS e O'BEIRNE, 2000). Essa bactéria foi capaz de sobreviver e crescer em chicória minimamente processada em temperatura de armazenamento de 3°C a 20°C, mas a taxa de crescimento foi significativamente reduzida quando a temperatura de estocagem variou de 20°C para 3°C (CARLIN et al., 1995).

Várias hortaliças minimamente processadas foram inoculadas com uma mistura de cinco estirpes de *L. monocytogenes* e incubadas a 4 e 10°C por 9 dias. Os autores observaram que praticamente em todas as hortaliças, a população de *L. monocytogenes* permaneceu constante a 4°C mas aumentou em número a 10°C (FARBER et al., 1998).

ODUMERU et al. (1997) analisaram a qualidade microbiológica de 361 amostras de hortaliças (65 não processadas e 296 hortaliças minimamente processadas) e detectaram *L. monocytogenes* em 6,7% das amostras estocadas a 10°C

após 7 dias e em 10,8% após 11 dias. Nas amostras mantidas a 4°C, o patógeno foi detectado em 2,8% delas. Esses pesquisadores demonstraram que a temperatura é um ponto de controle crítico para manter a qualidade e a segurança desses produtos.

SORIANO et al. (2001) avaliaram a ocorrência de espécies de *Listeria* em vários alimentos, crus e minimamente processados, obtidos de restaurantes de Valência, na Espanha. *L. monocytogenes* foi isolada de 3 das 103 amostras estudadas (2,9%), dentre estas, alface minimamente processada. *L. monocytogenes* foi encontrada em uma das embalagens de couve minimamente processada disponível comercialmente em Portugal (BEAULIEU et al., 1997). Este fato reforça a necessidade de um controle estrito durante toda a linha de processamento do produto e mais estudos quanto ao comportamento desse patógeno na couve.

Os dados da literatura enfatizam a importância de uma higiene adequada durante o processamento e embalagem de hortaliças minimamente processadas, principalmente após a sanitização, para evitar a recontaminação por patógenos, pois, além das dificuldades em remover bactérias patogênicas de saladas folhosas por processos como a lavagem e sanitização (ZHANG e FARBER, 1996), há o risco de crescimento e, ou sobrevivência de patógenos no produto refrigerado sob atmosfera modificada.

O processamento mínimo inclui operações como seleção, lavagem, descascamento, corte, fatiamento, sanitização, enxágue, centrifugação, sendo que o tecido vegetal permanece viável durante a subsequente manipulação (GIL, 1996; ODUMERU, 1997).

O manuseio de frutas e hortaliças minimamente processadas inicia-se com lavagem em água corrente (NGUYEN-THE e CARLIN, 1994), sendo essa uma etapa crítica do processamento, uma vez que interfere na qualidade, vida de prateleira e segurança desses produtos, principalmente porque não há tratamento de branqueamento para inativar microrganismos e enzimas (SIMONS e SANGUANSRI, 1997). Essa etapa remove resíduos do solo e fragmentos do vegetal, mas tem um efeito limitado na microbiota (NGUYEN-THE e CARLIN, 1994).

Tratamentos com químicos antimicrobianos oferecem oportunidade para se produzir frutas e hortaliças com concentrações reduzidas de patógenos (CHERRY, 1999). No entanto, a eficiência de um antimicrobiano depende de fatores ambientais,

que podem agir isoladamente ou em combinação, tais como, pH, atividade de água, temperatura, atmosfera e carga microbiana inicial (WILEY, 1994).

A sanitização é de fundamental importância para minimizar a deterioração e manter a qualidade do produto (BRACKETT, 1992). Vários sanitizantes estão sendo pesquisados e, ou utilizados, devido a sua capacidade para remover ou eliminar microrganismos, tais como compostos à base de cloro (BEUCHAT e BRACKETT, 1990; ZHANG e FARBER, 1996; BEAULIEU, et al., 1997; FRANCIS e O'BEIRNE, 1997); ácidos orgânicos, como láctico e acético (ZHANG e FARBER, 1996); peróxido de hidrogênio (SAPERS e SIMMONS, 1998) e prata produzida eletroliticamente (SIMONETTI et al., 1992).

O cloro é o sanitizante mais comumente usado em produtos hortícolas minimamente processados (SIMONS e SANGUANSRI, 1997). O uso de cloro por imersão ou aspersão é mencionado como sendo efetivo para reduzir a contaminação bacteriana de frutas e hortaliças (BRACKETT, 1987). Quando o cloro está presente em solução aquosa, há liberação do ácido hipocloroso (HClO) que, na sua forma não dissociada, apresenta efetividade maior. A qualidade da água utilizada durante a sanitização é essencial, pois o cloro reage com matéria orgânica e tem sua atividade biocida reduzida (SIMONS e SANGUANSRI, 1997). EL-KEST e MARTH (1988) avaliaram o efeito da matéria orgânica, utilizando-se 0,05 ou 0,1% de peptona, em soluções de hipoclorito a 10 e 20 mgL<sup>-1</sup> de cloro livre e verificaram que a presença da menor concentração de peptona já causava redução na concentração de cloro livre em solução. É essencial manter o pH da solução sanitizante dentro da faixa recomendada de 6,5 a 7,0, pois, se a água utilizada estiver mais alcalina, haverá menor quantidade de ácido hipocloroso, reduzindo com isso, sua efetividade, e se a água utilizada estiver mais ácida, torna-se corrosiva a determinadas superfícies ou equipamentos (SIMONS e SANGUANSRI, 1997).

A sanitização de folhas de hortaliças utilizando-se cloro normalmente não reduz a contaminação microbiana em mais do que 2 ciclos logarítmicos (NGUYEN-THE e CARLIN, 1994; CHERRY, 1999). BITTENCOURT (2000) observou uma redução significativa (P<0,05) de 1,2 a 2 ciclos logarítmicos no número de bactérias aeróbias mesófilas após a sanitização de couve minimamente processada imersa em uma solução com cloro na concentração de 200 mgL<sup>-1</sup> por 10 minutos. BRACKETT

(1987) imergiu couve de bruxelas (*Brassica oleraceae* cv. *germifera*) contaminada com *L. monocytogenes* em uma solução contendo 200 mgL<sup>-1</sup> de cloro e verificou uma redução de 2 ciclos log de células viáveis desse microrganismo. ZHANG e FARBER (1996) pesquisaram a ação de vários sanitizantes contra *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas. A sanitização com 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro por 10 minutos resultou no máximo de 1,3 e 1,7 reduções decimais de *L. monocytogenes* em alface e de 0,9 e 1,2 reduções decimais em repolho, respectivamente a 4 e 22°C.

Os ácidos orgânicos também são utilizados para sanitizar os alimentos e alguns podem agir como fungicidas ou fungistáticos, enquanto outros tendem ser mais efetivos em inibir o crescimento de bactérias (WILEY, 1994). O ácido láctico pode ser adicionado diretamente ao alimento minimamente processado e apresenta propriedades antimicrobianas por reduzir o pH abaixo da faixa de crescimento microbiano e por inibição metabólica promovida pelas moléculas do ácido não dissociado (WILEY, 1994).

Os resultados encontrados na literatura sobre a eficácia de ácidos orgânicos como sanitizantes são variados e dependentes de fatores tais como tipo e concentração dos ácidos, tempo de tratamento e microrganismo alvo. ZHANG e FARBER (1996) observaram uma redução significativa na população de *L. monocytogenes* inoculada em alface fatiada minimamente processada de aproximadamente, 0,5 e 0,2 ciclo logarítmico, com 1% de ácido láctico e 1% de ácido acético, respectivamente, após dez minutos de contato. Esses autores verificaram que os ácidos utilizados causaram perda de textura da hortaliça. FANTUZZI (1999) verificou uma redução significativa de, aproximadamente, um ciclo logarítmico na população de mesófilos aeróbios em repolho minimamente processado sanitizado com 1% de ácido acético por dez minutos, e observou que o ácido acético não causou dano aparente na textura da hortaliça.

O peróxido de hidrogênio é classificado como um composto GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro) para uso em alimentos como agente alvejante, oxidante, redutor e antimicrobiano. O principal objetivo do tratamento com peróxido de hidrogênio é estender a vida de prateleira por redução da população de microrganismos deterioradores na superfície do produto. SAPERS e SIMMONS (1998) imergiram produtos inteiros tais como cogumelos, pimentas e melões em 5 ou

10% de peróxido de hidrogênio por menos de dois minutos, antes de serem fatiados, e concluíram que esse tratamento foi efetivo em retardar a deterioração dos produtos. Nesse trabalho, maior extensão da vida de prateleira foi observada em melão minimamente processado tratado com 5% de peróxido de hidrogênio. Dados preliminares indicaram que o tratamento com peróxido de hidrogênio reduziu a população de *Pseudomonas fluorescens* em torno de 90% em cogumelo e em duas variedades de melão e esse resultado foi similar ao obtido com o cloro nas duas variedades citadas. Os autores não observaram efeito adverso nos produtos tratados com peróxido de hidrogênio quanto a aparência ou “flavor” (SAPERS e SIMMONS, 1998).

Resíduos de peróxido de hidrogênio em frutas e hortaliças tratadas podem ser eliminados passivamente pela ação de catalase endógena, ou ativamente, pelo enxágue imediatamente após o tratamento para evitar reações entre o peróxido de hidrogênio e constituintes do alimento que poderão afetar a qualidade ou a segurança do produto (SAPERS e SIMMONS, 1998).

A prata é outro agente antimicrobiano que tem sido utilizado, sendo mais efetivo contra bactérias; leveduras e fungos são inativados em menor extensão (FOEGEDING e BUSTA, 1991). O tratamento com prata é permitido em alguns países para água potável e outras bebidas, como suco de frutas, bebidas efervescentes e vinho. A prata pode ser usada na forma de prata coloidal (FOEGEDING e BUSTA, 1991). SIMONETTI et al. (1992) compararam a efetividade antimicrobiana de uma solução de prata obtida eletroliticamente ( $Ag_e$ ) com uma solução de sais inorgânicos ( $AgNO_3$ ) contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana da  $Ag_e$  foi superior a de  $AgNO_3$  contra os microrganismos testados, sendo mais efetiva contra *E. coli*. Esses autores concluíram também que a efetividade da prata foi significativamente ( $P < 0,05$ ) influenciada pela presença de íons  $Ag^+$  dos sais inorgânicos. AKIYAMA et al. (1998) avaliaram, “in vitro”, o efeito da prata em um modelo de biofilme imaturo formado por células de *Staphylococcus aureus* em superfície plástica e verificaram que, após incubação por 24 h a 37°C, houve uma redução da contagem de colônias em torno de 3.000 vezes comparado ao tratamento controle sem a prata.

Recentemente, há um crescente interesse em antimicrobianos naturais. Um dos motivos é a busca dos consumidores por alimentos mais naturais sem aditivos químicos. Os efeitos antimicrobianos de muitos extratos de plantas, óleos essenciais e condimentos têm sido documentados (PANDIT e SHELEF, 1994; BARA e VANETTI, 1995; KIM et al., 1995; HAO et al., 1998; CHERRY, 1999; KIM et al., 2001).

KIM et al. (1995) avaliaram a atividade antibacteriana de onze componentes de óleos essenciais sobre *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes* e *Vibrio vulnificus*, utilizando-se o método da difusão em disco de papel. Esses autores verificaram que cada espécie bacteriana respondeu diferentemente aos constituintes de óleos essenciais avaliados, desde nenhuma inibição à inativação da bactéria. Esses autores sugeriram a utilização de alguns componentes em alimentos para inibir o crescimento de patógenos. O efeito antibacteriano de vários condimentos sobre o crescimento de *Yersinia enterocolitica* foi avaliado “in vitro” e todos eles apresentaram efeito bacteriostático após 12 horas quando adicionados em concentrações de 4,1 a 4,7% (BARA e VANETTI, 1995). KIM et al. (2001) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato aquoso de pétalas de *Camellia japonica* L sobre vários patógenos veiculados por alimentos e verificaram um efeito inibitório no crescimento de todos os patógenos a 37°C, em meio de cultura, devido ao aumento da fase lag. SINGH et al. (2002) avaliaram o efeito dos sanitizantes dióxido de cloro aquoso (10 mgL<sup>-1</sup>, por 10 minutos), água ozonizada (10 mgL<sup>-1</sup>, por 10 min) e óleo de timo (0,1%, por 5 min), na inativação de *E. coli* O157:H7 inoculada na alface e verificaram que o óleo de timo foi o mais eficaz em reduzir a população do patógeno. Os extratos de plantas, como sanitizantes naturais, podem ser eficazes em reduzir ou mesmo inativar microrganismos patogênicos em alimentos minimamente processados. No entanto, há necessidade de mais pesquisas nessa área.

Uma outra etapa do processamento mínimo é a centrifugação que reduz a umidade do produto e remove o suco de extravasamento celular que podem favorecer o crescimento microbiano e reduzir a aceitação visual devido a reações enzimáticas (SIMONS e SANGUANSRI, 1997). A eficácia da centrifugação depende da velocidade e tempo de rotação da centrífuga e, segundo YILDIZ (1994), poucos

minutos de centrifugação são suficientes para a maioria dos produtos. Em couve minimamente processada, verificou-se que a velocidade e o tempo de rotação da centrífuga doméstica mais adequados para 1 Kg de produto foram, respectivamente, 800g e 10 minutos (CARNELOSSI, 2000).

Os produtos minimamente processados são mais perecíveis do que os intactos (FERRERES et al., 1997; ROLLE e CHISM, 1987; WATADA e QI, 1999). A injúria de células e tecidos e a falta de proteção pela casca, tornam os tecidos desidratados e, ou descorados (WATADA e QI, 1999). Os alimentos minimamente processados, portanto, apresentam respostas fisiológicas ao processamento, semelhante a plantas que foram submetidas a danos ou expostas a condições de estresse. Essa ação inclui aumento da respiração e produção de etileno (BRECHT, 1995) que podem acelerar o processo de deterioração. Além disso, os procedimentos adotados tais como, descascar, cortar ou fatiar, expõem o tecido vegetal ao ar, a superfícies e manipuladores, possibilitando a contaminação (AHVENAINEN, 1996).

Muitos fatores podem afetar a intensidade da resposta fisiológica em tecidos minimamente processados. Entre esses, têm-se espécie e variedade, estágio de maturidade fisiológica, extensão do ferimento ou injúria, temperatura, pressão de vapor da água e concentrações de oxigênio e dióxido de carbono (BRECHT, 1995). As mudanças na cor, sabor, aroma e textura causadas em frutas e hortaliças pós-colheita são direta ou indiretamente afetadas pelo etileno (ROLLE e CHISM, 1987). A produção de etileno é estimulada quando os tecidos da planta são injuriados e esse pode acumular na embalagem que contém o produto e, com isso, acarretar efeitos indesejáveis (WATADA e QI, 1999).

O fatiamento pode causar a perda de água dos tecidos que, adversamente, afeta a textura e a qualidade nutricional do produto (ROLLE e CHISM, 1987; BRECHT, 1995). O tecido injuriado induz também a síntese de algumas enzimas envolvidas em reações de escurecimento ou biossíntese de substratos, como a polifenol oxidase (KADER e BEN-YEHOSHUA, 2000).

O controle das conseqüências de injúrias em frutas e hortaliças minimamente processadas resulta no aumento da vida de prateleira e na extensão da manutenção nutricional, aparência, sabor e aroma, ou seja, na qualidade desses produtos (BRECHT, 1995).

Para estender a vida de prateleira de produtos minimamente processados, a principal medida de conservação é a refrigeração (MARTH, 1998) pois a temperatura é o fator mais importante que afeta as características gerais de qualidade do produto tais como aparência, textura, e conteúdo de vitaminas (WATADA e QI, 1999). Reações metabólicas são reduzidas duas a três vezes a cada redução de 10°C na temperatura (BRECHT, 1995). Um aumento de 10°C na temperatura de armazenamento fez com que a taxa respiratória da couve minimamente processada se elevasse em até duas vezes e meia (TELES, 2000). O aumento da taxa de respiração e da produção de etileno, assim como de outras reações associadas com injúrias do tecido, são minimizadas quando o produto fresco é processado a baixas temperaturas. As temperaturas da área de processamento e da água utilizada para o enxágue do produto devem ser o mais próximo possível de 0°C para que a efetividade máxima seja atingida. A utilização de temperaturas baixas durante o transporte, armazenamento e distribuição dos produtos minimamente processados, diminui a velocidade de senescência e outros processos metabólicos, reduz a deterioração e pode minimizar os efeitos do etileno (BRECHT, 1995). A temperatura ótima de armazenamento para a maioria dos produtos agrícolas é um pouco maior do que o ponto de congelamento do produto e é extremamente importante que a temperatura seja mantida constante para se obter bons resultados, já que amplas flutuações de temperatura tendem a promover deterioração prematura do produto (TASHTOUSH, 2000).

O principal problema associado com frutas e hortaliças minimamente processadas é a possibilidade de abuso de temperatura após a embalagem e durante a distribuição, transporte, armazenamento, comercialização ou, antes de serem consumidas (WILEY, 1994). Quando esse fato ocorre, há um potencial para uma proliferação rápida de organismos mesofílicos resultando na deterioração precoce com conseqüente redução da vida de prateleira do produto (MANVELL e ACKLAND, 1986). Em hortaliças prontas para o consumo estocadas a 10°C, houve um aumento significativo do número de mesófilos e psicrotróficos, incluindo o patógeno *L. monocytogenes*, comparado com hortaliças estocadas a 4°C (ODUMERU et al., 1997). THOMAS e O'BEIRNE (2000) avaliaram o impacto do abuso de temperatura na microbiota de hortaliças prontas para o consumo e

verificaram que a proliferação microbiana foi dependente da temperatura e do produto testados, sendo mais pronunciado a 12°C em todos os produtos com uma taxa de crescimento máxima de 0,140; 0,175 e 0,126 log<sub>10</sub> UFCg<sup>-1</sup> por hora em populações de *Listeria*, mesófilos aeróbios e bactérias do ácido lático, respectivamente.

A alteração na microbiota contaminante de couve minimamente processada causada por diferentes temperaturas de armazenamento foi avaliada também por BITTENCOURT (2000). Essa autora verificou que o crescimento de microrganismos mesófilos aeróbios foi inibido quando o produto foi estocado por 20 dias a 1°C. Entretanto, a estocagem a 5°C, no mesmo período, resultou em um aumento em torno de 2,8 ciclos logarítmicos e de, aproximadamente, 4,6 ciclos logarítmicos após 15 dias de estocagem a 10°C.

A refrigeração, combinada com embalagem sob atmosfera modificada, está sendo amplamente utilizada como a técnica mais eficaz de conservação das hortaliças minimamente processadas (FRANCIS e O' BEIRNE, 1997). Embalagem sob atmosfera modificada geralmente é definida como uma embalagem na qual o alimento é estocado em uma atmosfera diferente do ar; é um método para estender a vida de prateleira de alimentos perecíveis e semiperecíveis por alterar as proporções relativas dos gases atmosféricos que envolvem o alimento (FARBER, 1991). Essa modificação pode ser passiva, criada por meio da respiração do próprio produto dentro da embalagem, ou ativa, por meio da injeção de uma mistura de gases após a embalagem (KADER et al., 1989).

O sucesso da embalagem sob atmosfera modificada depende de muitos fatores, incluindo a qualidade inicial do produto, a higiene dos manipuladores, a seleção correta do material de embalagem, uma mistura de gases apropriada para o produto, a confiabilidade do equipamento de embalagem, e principalmente, o controle da temperatura (FARBER, 1991). A utilização de filmes poliméricos ou outros materiais plásticos de permeabilidade apropriada produzem, no interior da embalagem, uma concentração modificada de oxigênio e dióxido de carbono, que reduz significativamente a taxa de respiração do produto (SCHLIMME e ROONEY, 1994). A concentração baixa de oxigênio estabiliza a qualidade do produto,

reduzindo a atividade metabólica e o crescimento de microrganismos deterioradores aeróbios (AHVENAINEN, 1996).

Exposição a concentrações elevadas de oxigênio atmosférico pode, no entanto, estimular, não ter nenhum efeito ou reduzir taxas respiratórias, dependendo do produto, da maturidade e estágio de maturação, da concentração de oxigênio, do tempo e da temperatura de armazenamento e das concentrações de dióxido de carbono e etileno (KADER e BEN-YEHOSHUA, 2000). Diferentes microrganismos variam muito em sua sensibilidade à pressão parcial de oxigênio. O oxigênio pode inibir o crescimento de alguns anaeróbios pela oxidação de citocromos (KADER e BEN-YEHOSHUA, 2000). O dióxido de carbono é solúvel tanto em água quanto em lipídio e é responsável, principalmente, pelo efeito bacteriostático observado sobre microrganismos em atmosfera modificada, além do efeito inibitório na respiração do produto (FARBER, 1991).

Em armazenamento sob atmosfera modificada, as concentrações de oxigênio e dióxido de carbono são ajustadas para inibir certos processos, especialmente respiração, senescência e amolecimento do tecido. Produtos minimamente processados provavelmente, podem tolerar maiores tensões de oxigênio e dióxido de carbono pelo fato de não terem muita cutícula ou casca para restringir a difusão de gás, e porque a distância da difusão de gás do centro a parte mais externa do produto é muito menor do que no produto *in natura* (WATADA e QI, 1999). As concentrações mais efetivas dos gases que compõem a atmosfera devem ser estabelecidas para cada produto (HUXSOLL e BOLIN, 1989).

O aumento da segurança microbiológica em hortaliças minimamente processadas pode ser alcançado com a utilização de barreiras adicionais, como por exemplo, a competição microbiana, bacteriocinas e outros compostos GRAS. O uso de bactérias lácticas como competidoras da microbiota deterioradora e patogênica é amplamente estudado em produtos cárneos e lácticos, mas só recentemente, sua aplicação em frutas e hortaliças minimamente processadas tem sido considerada. Bactérias do ácido láctico apresentam atividade antagonista à microrganismos indesejáveis ou patogênicos, causada pela competição por nutrientes e pela produção de metabólitos antimicrobianos (HOLZAPFEL et al., 1995). O ácido láctico é o principal produto da fermentação de bactérias do ácido láctico e pode reduzir o pH a

valores em que bactérias deterioradoras e patogênicas são inibidas ou inativadas (HOLZAPFEL et al., 1995).

A taxa de crescimento e a competitividade de uma cultura láctica são determinadas pela sua adaptação ao substrato e por vários fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo potencial redox, atividade de água, pH e temperatura (HOLZAPFEL et al., 1995; GUERZONI et al., 1996; BREIDT e FLEMING, 1997). HARRIS et al. (1989) verificaram que em um total de 14 estirpes de bactérias produtoras de bacteriocina pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus*, sete inibiram o crescimento de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em um teste de antagonismo em ágar BHI (Infusão Cérebro Coração). Bactérias do ácido láctico, inoculadas em saladas mistas minimamente processadas, reduziram significativamente, o número de bactérias mesofílicas totais durante o armazenamento sob refrigeração (VESCOVO et al., 1995). VESCOVO et al. (1996) demonstraram que estirpes de bactérias do ácido láctico, isoladas de saladas mistas prontas para o consumo, produziram substâncias antimicrobianas e essas culturas colonizaram as hortaliças quando inoculadas artificialmente. Entretanto, BENNIK et al. (1999) verificaram que *Enterococcus mundtii*, uma espécie bacteriocinogênica, isolada de hortaliças minimamente processadas, não inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* em brotos de feijão frescos. Por essa razão, esses autores sugeriram a não utilização dessa cultura como biocontrole de *L. monocytogenes* em hortaliças estocadas sob atmosfera modificada.

O potencial da aplicação de bactérias do ácido láctico como agentes bioconservantes, para controlar o crescimento microbiano por inibição competitiva de bactérias patogênicas, precisa ser avaliado mais extensivamente, como uma alternativa para aumentar a segurança e a extensão da vida de prateleira dos alimentos refrigerados minimamente processados (BREIDT e FLEMING, 1997). Com isso, a preservação biológica deve ser considerada como uma medida adicional e não como uma substituição das Boas Práticas de Manipulação. Em adição, sob condições de abuso de temperatura, atividades metabólicas das bactérias do ácido láctico, podem servir como um indicador dos riscos microbiológicos (HOLZAPFEL et al., 1995).

Entre as hortaliças de importância econômica para o Brasil, a couve destaca-se como uma das mais comercializadas e consumidas. Aspectos do processamento mínimo da couve foram considerados em outros estudos. CARNELOSSI (2000) concluiu que a taxa respiratória da folha foi altamente afetada pelo horário de colheita das folhas, mas este não afetou o seu tempo de vida de prateleira e sua qualidade. Esse autor verificou também que o pré-resfriamento das folhas de couve antes do processamento reduziu o metabolismo do produto, mas não aumentou seu tempo de armazenamento e que a baixa temperatura de sanitização, além de diminuir a taxa respiratória do produto minimamente processado, proporciona um produto de qualidade, baseado nos teores de sólidos solúveis, vitamina C e atividade de polifenol oxidase.

BITTENCOURT (2000) determinou a seqüência das etapas adequada ao processamento mínimo da couve em, sanitização seguida do fatiamento e enxágue. Essa autora verificou que os psicotróficos constituíram a microbiota predominante em todas as temperaturas de estocagem (1, 5 e 10°C) e, aproximadamente 91% dessa microbiota era constituída de bastonete Gram-negativo, enquanto as bactérias anaeróbias e lácticas foram as que apresentaram um maior incremento na população de até seis ciclos logarítmicos ao final de 15 dias a 10°C.

TELES (2000) verificou que as combinações de embalagem x mistura gasosa mais eficazes para a manutenção da concentração de sólidos solúveis totais e vitamina C, em couve armazenada a 5°C por 14 dias foram, poliolefina multicamada com modificação ativa da atmosfera (0% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>), poliolefina multicamadas com modificação passiva da atmosfera e bandejas de poliestireno expandido envoltas por filme de policloreto de vinila, com modificação passiva da atmosfera. Esse autor concluiu também que a diminuição da concentração de oxigênio fez com que a taxa respiratória da couve reduzisse em até quatro vezes à temperatura ambiente.

DANTAS (2001) concluiu que o consumidor considera as informações contidas nos rótulos das embalagens de couve minimamente processada como expoente da qualidade exigida do produto, observando a data de validade, preço, marca, informações nutricionais e ingredientes. Os benefícios da informação nas embalagens podem ser refletidos, em parte, pela seleção de alimentos melhores que por sua vez, podem proporcionar uma dieta mais nutritiva.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia e no laboratório de Fisiologia Pós-Colheita do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - MG.

#### 3.1. Matéria-prima

Foram utilizadas plantas de couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) cultivadas na horta da Universidade Federal de Viçosa, com plantios periódicos para a obtenção de folhas durante todo o experimento, realizado entre março de 2001 a maio de 2002. As folhas de, aproximadamente, 35 a 40 cm de comprimento foram colhidas, transportadas imediatamente até o laboratório de Fisiologia Pós-Colheita e colocadas em bandejas com os pecíolos imersos em água e armazenadas em câmara fria a  $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , até a manhã do dia seguinte (CARNELOSSI, 2000), quando foram processadas.

#### 3.2. Processamento Mínimo

O processamento mínimo consistiu das etapas de seleção, lavagem, sanitização, fatiamento, enxágue, centrifugação, embalagem e armazenamento de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1 (BITTENCOURT, 2000), com exceção para o experimento 3.3. As folhas de couve foram selecionadas pelo tamanho e cor, rejeitando-se as unidades aparentemente danificadas.

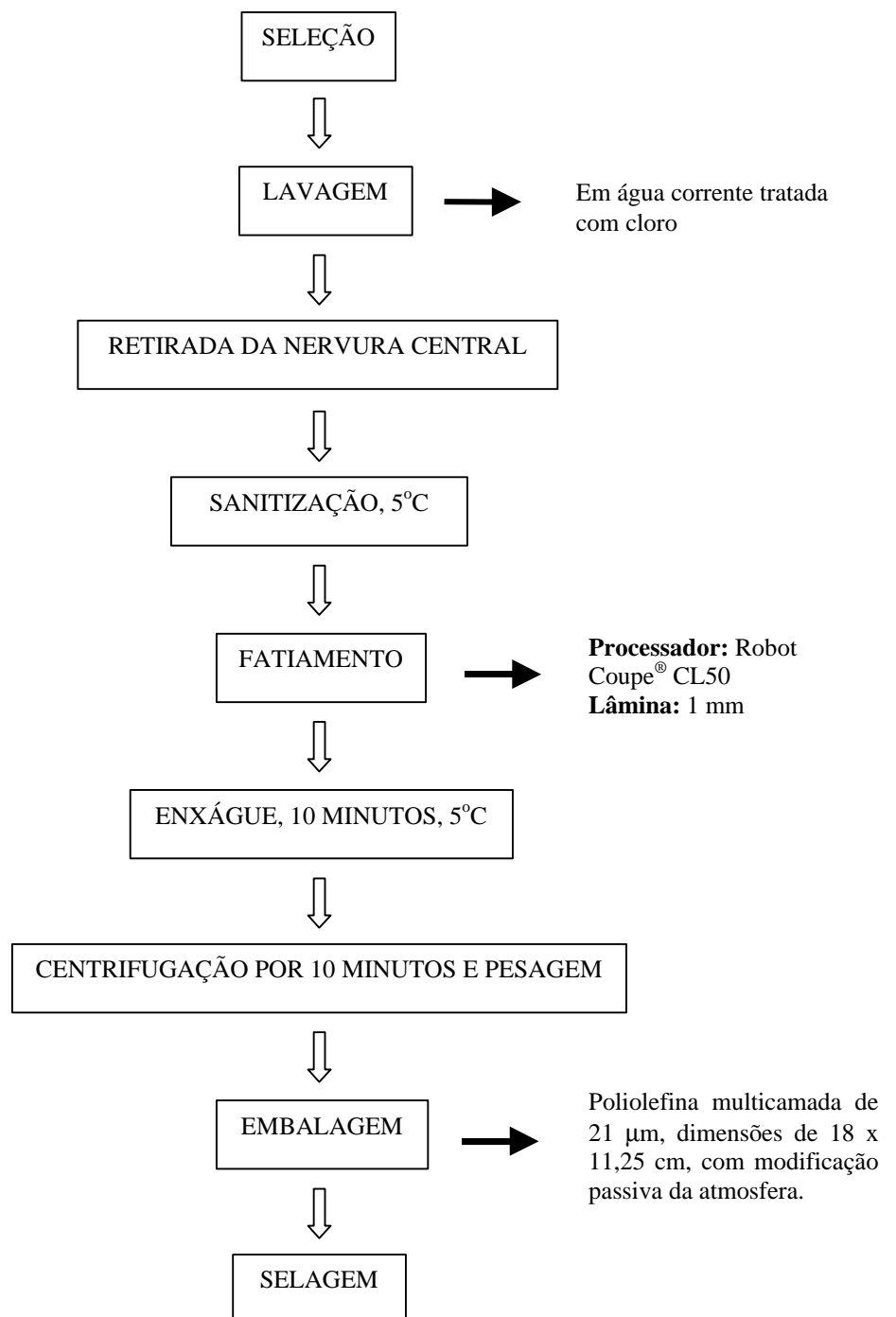


Figura 1: Fluxograma do processamento mínimo da couve (BITTENCOURT, 2000)

Todas as etapas do processamento mínimo foram realizadas em laboratório refrigerado.

### **3.3. Determinação das condições de sanitização**

#### **3.3.1. Avaliação do tempo de sanitização**

Foram avaliados os tempos de 10, 20 e 30 minutos de contato da hortaliça com duas soluções sanitizantes que consistiram do Sumaveg<sup>®</sup>, à base de cloro, de uso recomendado para frutas e verduras e cujo princípio ativo é o Dicloro S. Triazinatriona Sódica Dihidratada, usado na concentração de 200mgL<sup>-1</sup> e o Sumaveg<sup>®</sup> acrescido de 1% de ácido láctico. O processamento mínimo da couve seguiu-se como descrito na Figura 1, exceto a etapa de sanitização, a qual foi realizada após o fatiamento e em 30g do produto. Cada porção de 30g de couve, ficou imersa por 10, 20 ou 30 minutos nas soluções sanitizantes já referidas. Para o controle da efetividade do processo de sanitização, porções contendo 30g de couve fatiada foram imersas em um recipiente contendo apenas água.

Os tratamentos foram conduzidos em três repetições.

Após a selagem das embalagens contendo couve, as mesmas foram levadas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos para as análises de mesófilos aeróbios.

As análises foram efetuadas em porções de 25g do material vegetal pesado assepticamente e homogeneizado em copos de liquidificador esterilizados com 225 mL de água peptonada 0,1% (Merck). Em seguida, realizaram-se diluições decimais apropriadas, para a obtenção de contagens entre 25 e 250 colônias por placa. A contagem padrão de mesófilos aeróbios foi feita em ágar padrão para contagem – PCA (Merck), utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície, após incubação a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos em log de UFCg<sup>-1</sup> de couve minimamente processada.

O tempo de sanitização mais efetivo, dentre os avaliados, foi utilizado nas etapas de sanitização do processamento mínimo conduzidas posteriormente.

#### **3.3.2. Avaliação da efetividade de sanitizantes**

Os sanitizantes, apresentados no Quadro 1, foram avaliados quanto sua efetividade em reduzir o número de mesófilos aeróbios naturalmente presentes e de *L. monocytogenes* inoculada na couve minimamente processada.

As concentrações das soluções estoque e diluídas de ácido peracético foram determinadas de acordo com o manual técnico do produto comercial Vortexx (1999).

As soluções de prata coloidal foram obtidas utilizando-se um gerador de prata coloidal de 36 Volts, produzido por Ritz Laussac Eletronics, conectado com dois eletrodos de prata. Esses eletrodos foram imersos em um bequer de vidro com 250 mL de água, durante 6 minutos, o que resulta, em aproximadamente, 5 mg L<sup>-1</sup> de prata coloidal.

Quadro 1: Concentração das soluções sanitizantes avaliadas em couve minimamente processada

<b>SANITIZANTE</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
<b>Ácido peracético</b>	60 ppm
<b>Clorado orgânico (Sumaveg<sup>®</sup>)</b>	200 ppm
<b>Extrato hidroalcolico de <i>Salvia officinalis</i></b>	1%
<b>Peróxido de hidrogênio (ISO FAR)</b>	5%
<b>Prata coloidal</b>	2,5 ppm

Foram realizadas as etapas do processamento mínimo (Figura 1) seguindo as mesmas alterações das etapas mencionadas no item 3.3.1, utilizando-se os sanitizantes relacionados no Quadro 1.

Para a avaliação da efetividade dos sanitizantes em reduzir a população de mesófilos aeróbios, porções com 30g de couve fatiada foram imersas em soluções com um volume final de 600 mL. O controle da efetividade do processo de sanitização foi feito com o produto imerso em água. O pH de cada solução sanitizante foi determinado com potenciômetro Digimed (DM 20 – Brasil). A determinação do número de mesófilos aeróbios foi feita como descrito anteriormente, em ágar PCA.

Para se avaliar o efeito dos sanitizantes sobre *L. monocytogenes*, a couve foi minimamente processada, excetuando-se a etapa de sanitização. Duas estirpes de *L. monocytogenes*, Scott A e ATCC 7644, foram ativadas por 18 horas a 35°C em TSB (Caldo Trypticase de Soja - Difco) acrescido de 0,6% de extrato de levedura. As duas culturas foram misturadas, em uma mesma proporção, atingindo uma concentração

final de, aproximadamente,  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup>. A partir desse inóculo, foram feitas diluições sucessivas, até se atingir uma concentração de  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup>. Assepticamente, as embalagens de couve foram abertas e inoculadas com 1 mL da diluição com  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> do patógeno. As embalagens controle foram inoculadas apenas com 1 mL de água esterilizada. As embalagens foram novamente fechadas e armazenadas por aproximadamente, 15 horas a 4°C, para que as células de *Listeria* aderissem à couve, antes de expô-las aos sanitizantes, como recomendado por ZHANG e FARBER (1996).

Após o período de 15 horas, as embalagens foram perfuradas assepticamente, antes de serem imersas nas soluções sanitizantes, para que todo o conteúdo da embalagem entrasse em contato com a solução. Após a sanitização, fez-se o enxágue, e em seguida, análise de *L. monocytogenes* nas porções de couve minimamente processada. A contagem de *Listeria* foi feita em ágar seletivo Oxford (Oxoid), adicionado de suplemento seletivo SR 140E (Oxoid). A presença de colônias típicas de *Listeria* foi avaliada após a incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas e os resultados foram expressos em log de UFCg<sup>-1</sup> de couve minimamente processada.

Todas as análises microbiológicas foram feitas em duplicata e os tratamentos foram conduzidos em três repetições. As soluções sanitizantes foram usadas uma única vez.

#### **3.4. Seleção de bactéria láctica com atividade antilistérica**

Com o objetivo de selecionar bactérias lácticas que apresentassem atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* nas condições de refrigeração adotadas no armazenamento de couve minimamente processada, foram avaliadas as culturas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649, *Lactobacillus plantarum* (Laboratorium Wiesby) e *Lactobacillus casei* CCT 1465. As culturas denominadas de BNCCR5, CCA3 e CCA7 foram isoladas de couve minimamente processada estocada por seis dias a 7 e 21°C, com acréscimo de 2,5% de cloreto de sódio. Todas as culturas usadas neste experimento foram submetidas aos testes de coloração de Gram, catalase e confirmação da produção de ácido em ágar de Man, Rogosa, Sharpe (MRS – Oxoid) acrescido de 0,04 gL<sup>-1</sup> de púrpura de bromocresol (Merck) e 5,0 gL<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio (Vetec) após incubação a 30°C por 48 horas sob

microaerofilia. As culturas puras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em caldo MRS acrescido de 2% de glicerol.

O primeiro critério utilizado para a seleção da cultura láctica a ser inoculada na couve foi a capacidade de crescimento sob refrigeração. As culturas lácticas usadas neste estudo foram ativadas, a partir do estoque a  $-80^{\circ}\text{C}$ , em caldo MRS a  $35^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Foram utilizados  $200\mu\text{L}$  como inóculo de cada cultura padronizada a uma densidade óptica (D.O.) igual a 0,1 medida em espectrofotômetro Spectronic 20 D a 600 nm. O inóculo foi transferido para três tubos contendo 5 mL de caldo MRS e esses tubos foram incubados a 5, 10 e  $15^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

O segundo critério para a seleção da cultura láctica foi a capacidade de inibição de *L. monocytogenes* por meio da técnica de difusão (SPELHAUG e HARLANDER, 1989). Inocularam-se microgotas de 5  $\mu\text{L}$  da cultura láctica padronizada (D.O. de 0,4) na superfície do meio sólido MRS adicionado de púrpura de bromocresol e carbonato de cálcio nas concentrações já mencionadas. As placas foram incubadas, sob microaerofilia, nas temperaturas de crescimento de 5, 10 ou  $15^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento das culturas lácticas observado por meio da acidificação do ágar, foram vertidos cuidadosamente sobre este meio, 8 mL de TSB semi-sólido com  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas nas temperaturas citadas acima até o crescimento do patógeno no ágar. A capacidade de inibição foi avaliada pela medida do diâmetro da zona clara ao redor da microgota de cultura láctica.

Formulou-se o ágar MRS modificado com 0,2% de glicose, para verificar se a inibição de *L. monocytogenes* pelas bactérias lácticas era devido a algum outro produto além do ácido.

### **3.5. Avaliação do crescimento de *L. monocytogenes* em couve minimamente processada na presença ou não da bactéria láctica selecionada**

O crescimento de *L. monocytogenes* em couve minimamente processada foi acompanhado no produto estocado a 5, 10 e  $15^{\circ}\text{C}$ , na presença ou não da bactéria láctica selecionada. Para o processamento mínimo, foram utilizadas as etapas descritas no fluxograma (Figura 1), como determinado por BITTENCOURT (2000). Quantidades de 50g de couve minimamente processada foram acondicionadas em

embalagens de poliolefina multicamada de 21 µm de espessura, dimensões de 18 x 11,25, possuindo uma permeabilidade a oxigênio e dióxido de carbono de, respectivamente, 9.745 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> e 28.766 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> com a modificação passiva da atmosfera. Posteriormente, as embalagens foram seladas hermeticamente, utilizando-se a seladora Selovac – 200B.

### **3.5.1. Preparação dos inóculos de *L. monocytogenes* e da bactéria láctica**

Foram utilizadas quatro estirpes de *L. monocytogenes* Scott A, ATCC 7644, IP2-40 e 764/93 obtidas do estoque de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos/DMB.

As estirpes de *L. monocytogenes* foram ativadas em tubos com 5 mL de caldo TSB + 0,6% de extrato de levedura (Merck) a 35 ± 2°C por 17 horas. Após a ativação, as estirpes de *L. monocytogenes* foram misturadas, na mesma proporção, em um único tubo. A estirpe de bactéria láctica selecionada a partir dos testes realizados anteriormente foi ativada em 5 mL de caldo MRS, a 35 ± 2°C por 17 horas, quando atingiu a população de, aproximadamente, 10<sup>9</sup> UFCmL<sup>-1</sup>.

As células de *Listeria* e da bactéria láctica foram coletadas por centrifugação a 2043 x g por 15 minutos em centrífuga Sorvall RC5C; lavadas em solução salina 0,85%, novamente centrifugadas e ressuspendidas com solução salina 0,85%.

A suspensão de células de *L. monocytogenes* foi padronizada em D.O. igual a 0,27 utilizando-se o comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro Spectronic 20 D e que corresponde, segundo GIOMBELLI (2000), a 10<sup>8</sup> UFCmL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*. Diluições sucessivas foram feitas, para inoculação de, aproximadamente, 10<sup>5</sup> UFC de *Listeria* por grama de couve.

### **3.5.2. Inoculação de *L. monocytogenes* e da bactéria láctica selecionada em couve minimamente processada**

Embalagens contendo 50g de couve minimamente processada foram preparadas e levadas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos para a inoculação de *L. monocytogenes* e da bactéria láctica. Em um total de 39 embalagens, 13 foram inoculadas com estirpes de *L. monocytogenes*, 13 foram inoculadas com as estirpes de *Listeria* juntamente com a estirpe de bactéria láctica

selecionada e as 13 embalagens restantes foram destinadas como controle. Em todas embalagens controle, inoculou-se 1 mL de água destilada esterilizada. A inoculação foi feita com seringas descartáveis esterilizadas sendo que a agulha da seringa foi introduzida nas embalagens através de septos confeccionados com cola de silicone, aderidos à superfície das embalagens.

Para a inoculação das estirpes de *Listeria* juntamente com bactéria láctica, volumes equivalentes (em mL) para alcançar  $10^5$  de *Listeria* e  $10^8$  de bactéria láctica foram homogeneizados e 1 mL desta suspensão foi inoculado na couve minimamente processada pelo procedimento mencionado acima.

Após a inoculação das culturas, as embalagens de couve minimamente processadas foram distribuídas em bandejas e armazenadas em estufas tipo B.O.D. a 5, 10 e 15°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Amostras no tempo zero e após 5, 10, 15 e 20 dias de armazenamento para as embalagens incubadas a 5 e 10°C e após 2, 4, 6, e 8 dias para as embalagens incubadas a 15°C foram retiradas para se proceder as análises microbiológicas e de acidez titulável.

### **3.6. Análises microbiológicas de couve minimamente processada**

As análises foram efetuadas em porções de 25g do material vegetal pesadas assepticamente e homogeneizadas em copos esterilizados de liquidificador com 225 mL de água peptonada 0,1%. Diluições decimais apropriadas foram feitas para a obtenção de contagens entre 25 e 250 colônias por placa.

A contagem de *L. monocytogenes* foi feita em ágar seletivo Oxford para *Listeria* adicionado de suplemento seletivo e a presença de colônias típicas foi avaliada após a incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas. Colônias pretas, com morfologia característica e circundadas por halo escuro resultante da hidrólise da esculina, em ágar Oxford, foram consideradas típicas de *Listeria*. Quatro colônias típicas, por diluição, foram selecionadas para a confirmação do gênero *Listeria* por meio de reação da catalase e teste de motilidade em ágar semi-sólido (Difco) com incubação a 23°C por, aproximadamente, 72h. Para a confirmação da espécie *L. monocytogenes*, foi realizado o teste -hemólise em placas contendo ágar sangue (Oxoid) adicionado de sangue de carneiro.

A microbiota contaminante da couve minimamente processada foi avaliada pela contagem padrão de psicotróficos aeróbios em PCA (Merck), usando-se a técnica do espalhamento em superfície, após a incubação a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 10 dias.

A determinação de bactérias produtoras de ácido foi feita em ágar MRS, adicionado de  $0,04 \text{ gL}^{-1}$  de púrpura de bromocresol e  $5,0 \text{ gL}^{-1}$  de carbonato de cálcio, após incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 48 horas, em jarras Gas-Pack, sob microaerofilia. Após a incubação, foram consideradas bactérias lácticas aquelas cujas colônias apresentaram halo amarelo, caracterizando a produção de ácido, e que foram catalase negativas (VEDAMUTHU et al., 1992)

### **3.7. Determinação da acidez titulável em couve minimamente processada**

A acidez titulável da couve foi determinada em todos os tratamentos, nas três repetições, utilizando-se do mesmo homogenato destinado às análises microbiológicas, com o intuito de se avaliar a acidez expressa como porcentagem de ácido láctico. Para a titulação, utilizou-se uma solução padronizada de hidróxido de sódio na concentração de 0,1 N e fenolftaleína como indicador (CASE et al., 1985).

### **3.8. Análises estatísticas**

O experimento para a avaliação do tempo de sanitização foi realizado segundo o delineamento inteiramente casualizado com três tempos (10, 20 e 30 minutos) mais um tratamento controle para cada tempo, cada um com duas repetições. O experimento para o teste de sanitizantes também foi realizado segundo o delineamento inteiramente casualizado com cinco produtos (clorado orgânico, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, prata coloidal e extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis*) mais um tratamento controle, cada um com duas repetições. O teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ) foi utilizado, nos dois experimentos, para comparação de médias dos logaritmos do número de unidades formadoras de colônia por grama ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ), com exceção da avaliação dos sanitizantes para a redução do número de *L. monocytogenes*, que se utilizou da comparação do número de unidades formadoras de colônia por grama ( $\text{UFC g}^{-1}$ ).

Para o estudo da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) de *L. monocytogenes* na couve minimamente processada, o experimento foi conduzido

segundo o delineamento inteiramente casualizado com três temperaturas (5, 10 e 15°C), dois tratamentos, com e sem o isolado CCA3, com três repetições. O teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ) foi utilizado para a comparação das médias das velocidades específicas.

Os dados de cada tempo referentes às Figuras 6, 7, 8 e 9, foram analisados pelo intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade ( $n=3$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Condições de sanitização da couve

#### 4.1.1. Tempo de sanitização

O tempo de 10 minutos de contato da couve fatiada com o sanitizante clorado orgânico (Sumaveg<sup>®</sup>) e o clorado orgânico + 1% de ácido láctico promoveu uma redução de até 2 ciclos logarítmicos no número de bactérias mesófilas aeróbias em relação ao controle (Quadro 2). Não houve diferença significativa entre as soluções sanitizantes avaliadas e o aumento do tempo de sanitização para até 30 minutos não resultou em variações significativas na microbiota contaminante da couve fatiada (Quadro 2). O tempo de sanitização de 10 minutos é recomendado pelo fabricante do Sumaveg<sup>®</sup> e, como constatado por alguns autores, o aumento do tempo de sanitização não resulta em maior redução da microbiota contaminante.

ADAMS et al. (1989) relataram que o aumento do tempo de exposição da alface em uma solução de hipoclorito, de 5 para 30 minutos, não promoveu uma redução adicional na contagem da microbiota total. ZHANG e FARBER (1996) imergiram 200g de repolho e alface minimamente processados inoculados com *L. monocytogenes*, em uma solução de cloro com 200 mg L<sup>-1</sup> por 1, 2, 5 e 10 minutos. Esses autores observaram que houve uma maior redução do número de *L. monocytogenes* (1,2 e 1,7 ciclos logarítmicos no repolho e na alface, respectivamente, a 22°C) com 10 minutos de sanitização. EL-KEST e MARTH

(1988) expuseram células de *L. monocytogenes* por um período de 30 segundos a 4 horas em soluções de hipoclorito de sódio com 0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo e constataram que, em geral, a redução do número desse patógeno foi mais acentuada nos primeiros 30 segundos, seguida de uma pequena redução durante o restante do tempo de exposição avaliado.

O pH da solução com o clorado orgânico foi 6,8 (Quadro 2) e este valor está dentro da faixa recomendada para soluções sanitizantes que contém cloro. A combinação de ácido láctico com o clorado orgânico reduziu o pH da solução sanitizante (Quadro 2), sem alterar a efetividade do cloro na solução. No entanto, visualmente, foi observada alteração de textura da couve sanitizada com clorado orgânico acrescido de 1% de ácido láctico. ZHANG e FARBER (1996) verificaram uma redução significativa de aproximadamente 0,5 ciclo logarítmico na população de *L. monocytogenes* inoculada em alface minimamente processada sanitizada com 1% de ácido láctico. Esses autores também observaram alteração de textura da alface quando sanitizada com os ácidos láctico e acético. Na sanitização de repolho minimamente processado com 1% de ácido acético, FANTUZZI (1999) observou uma redução na microbiota de mesófilos aeróbios em torno de 1,2 ciclos logarítmicos sem contudo registrar danos aparentes na textura da hortaliça.

Quadro 2: Número (log UFC g<sup>-1</sup>) de mesófilos aeróbios contaminantes (média de duas repetições) da couve minimamente processada e valores de pH das soluções, após a sanitização à temperatura ambiente por diferentes tempos

Tratamentos	Tempo de sanitização (min)			pH
	10	20	30	
Clorado Orgânico – 200 mgL <sup>-1</sup>	3,6 b	3,6 b	4,4 b	6,8
Clorado Orgânico (200 mgL <sup>-1</sup> ) + 1% Ácido Láctico	3,7 b	3,7 b	4,1 b	2,4
Controle	5,6 a	5,4 a	5,5 a	7,9

Médias seguidas de mesma letra, horizontal e verticalmente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Uma vez que não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os três tempos de sanitização avaliados, optou-se por utilizar, no processamento mínimo da couve, a sanitização por 10 minutos. Este tempo, por ser o menor dentre os avaliados, é o mais favorável economicamente para uma indústria.

A adição de 1% de ácido láctico na solução com Sumaveg<sup>®</sup>, não promoveu uma redução adicional no número da microbiota avaliada, não se justifica portanto, a utilização da combinação desse ácido no experimento seguinte.

#### **4.1.2. Efetividade dos sanitizantes**

A sanitização da couve fatiada promoveu uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) de, no máximo, 1,9 ciclos logarítmicos no número de bactérias mesófilas aeróbias e de 1,1 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* quando comparados com o controle (Figura 2). A contaminação inicial de mesófilos aeróbios no controle foi de  $2,2 \times 10^4$  UFCg<sup>-1</sup>, enquanto que o número de células de *L. monocytogenes* recuperadas após a inoculação de  $10^5$  UFCg<sup>-1</sup> foi de  $8,1 \times 10^4$  UFCg<sup>-1</sup> de couve minimamente processada.

A redução de, aproximadamente, 1 ciclo logarítmico no número de bactérias mesófilas aeróbias também foi observada por BEAULIEU et al. (1997) ao sanitizarem couve minimamente processada com clorado orgânico em solução contendo 0,1% de cloro. BEUCHAT et al. (1998) verificaram uma redução de, no máximo, 1 ciclo logarítmico no número de bactérias mesófilas aeróbias imergindo folhas de alface em uma solução sanitizante com 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro, quando comparada com folhas lavadas apenas com água.

A redução significativa ( $P < 0,05$ ) de 1,1 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* inoculada na couve (Figura 2) é semelhante à observada por ZHANG e FARBER (1996) em repolho quando imergiram a hortaliça em uma solução contendo 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro, por um período de 10 minutos. BRACKETT (1987) encontrou uma redução de, aproximadamente, 2 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* inoculada em couve de bruxelas, após imersão em uma solução contendo 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre, em comparação ao produto imerso apenas em água.

O ácido peracético, na concentração de  $60 \text{ mg L}^{-1}$ , reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) a população de mesófilos aeróbios em torno de 1,8 ciclos logarítmicos, enquanto a população de *L. monocytogenes* apresentou uma redução em torno de 0,9 ciclo logarítmico (Figura 2). Esta diferença de quase 1 ciclo logarítmico pode ser atribuída a uma menor susceptibilidade de *L. monocytogenes* ao ácido peracético, ou mesmo devido a maior adesão das células de *L. monocytogenes* na couve fatiada. HILGREN e SALVERDA (2000) verificaram uma redução na população de mesófilos aeróbios de 1,54; 1,07 e 0,84 ciclos logarítmicos, após a imersão, respectivamente, de batata, aipo e repolho minimamente processados, por 30 segundos em uma solução com  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido peracético.

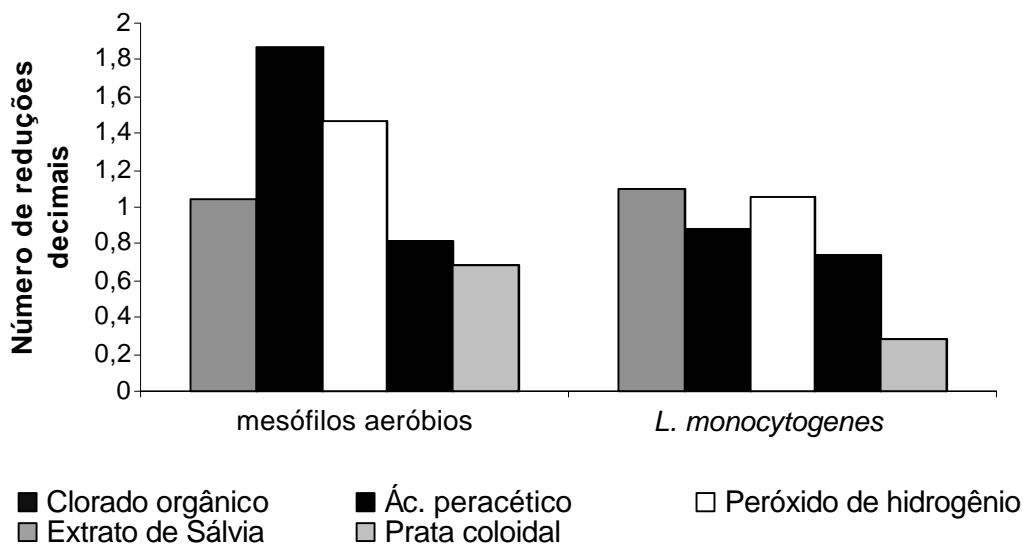


Figura 2: Número de reduções decimais de mesófilos aeróbios contaminantes e *L. monocytogenes* inoculada com  $10^6 \text{ UFCg}^{-1}$ , em couve minimamente processada submetida a diferentes sanitizantes à temperatura ambiente por 10 minutos.

Embora a solução de 5% de peróxido de hidrogênio tenha promovido a redução da população de mesófilos aeróbios em 1,5 ciclos logarítmicos, esta redução não foi estatisticamente diferente do obtido com ácido peracético. Reduções de 1 a 2 ciclos logarítmicos no número de bactérias epifíticas foram observadas por BENNIK et al. (1996) na sanitização de chicória por 2 minutos em solução de 10% de peróxido de hidrogênio quando comparado com amostras lavadas com água.

Houve redução significativa de 1,1; 1,0; 0,9 e 0,7 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* quando couve fatiada foi sanitizada com clorado orgânico, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e extrato de *Salvia officinalis* (sálvia), respectivamente, em relação ao controle. Contudo, a redução do número de *L. monocytogenes* observada com esses sanitizantes não foi estatisticamente diferente. SAPERS e SIMMONS (1998) verificaram uma redução, em torno de 90%, na população de *Pseudomonas fluorescens* em cogumelos e em duas variedades de melão minimamente processados tratados em uma solução com 5% de peróxido de hidrogênio. Essa redução de 90% na microbiota relacionada foi similar quando as variedades de melão foram sanitizadas com uma solução contendo cloro.

A solução com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de prata coloidal reduziu o número de mesófilos aeróbios e *L. monocytogenes* em torno de 0,7 e 0,3 ciclo logarítmico, respectivamente, apresentando portanto, menor efetividade que os demais sanitizantes avaliados. Resultados apresentados por SIMONETTI et al. (1992) evidenciaram que a atividade antimicrobiana de soluções de prata varia de acordo com a espécie microbiana. Esses autores avaliaram soluções a 10<sup>-6</sup> M de Ag<sub>e</sub> a pH 6,5, em suspensões de 10<sup>6</sup> células/mL de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* e verificaram que após 60 minutos de contato, a sobrevivência dos microrganismos foi de 0 a 1%, 14 a 16%, 8,5 a 15% e de 6,4 a 10%, respectivamente. Nesse mesmo estudo, esses autores verificaram que a ação antimicrobiana da prata (Ag<sub>e</sub>) foi afetada pelo pH e foi maior em meio alcalino.

Os valores de pH das soluções contendo prata coloidal, clorado orgânico, peróxido de hidrogênio, extrato hidroalcolico de *Salvia officinallis* e ácido peracético foram, respectivamente, 7,8; 6,2; 5,7; 5,3 e 3,9.

#### **4.2. Bactéria láctica selecionada com atividade antilistérica**

Dentre as culturas avaliadas, os isolados de couve CCA3 e BNCCR5 e a cultura de *Lactobacillus casei* apresentaram maior crescimento a 5, 10 e 15°C (Figura 3).

Foi constatada que a inibição de *L. monocytogenes* pelas bactérias lácticas que cresceram a 15°C ocorreu em ágar MRS contendo 2,0% de glicose, mas não na

presença de 0,2 % desse açúcar. Este resultado permite sugerir que a inibição ocorreu, provavelmente, devido à produção de ácido pelas bactérias lácticas.

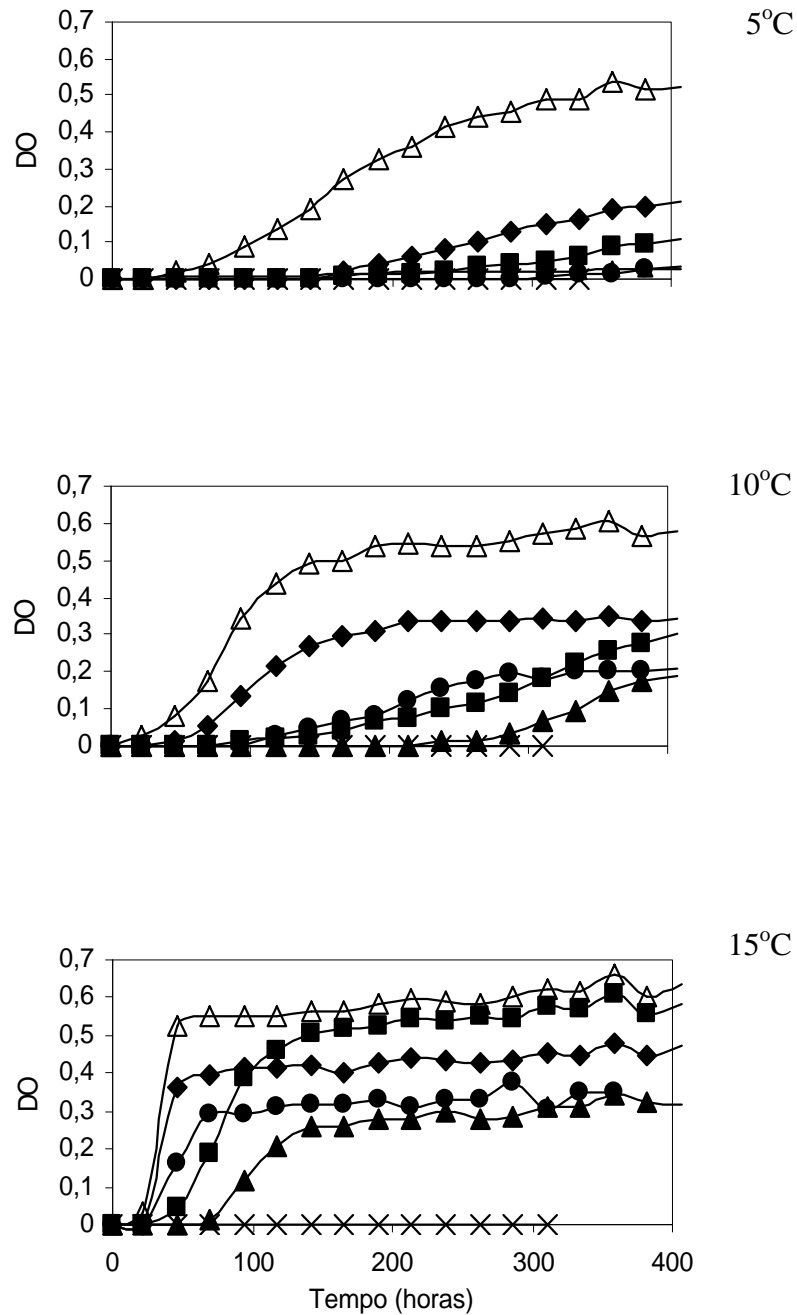


Figura 3. Crescimento das bactérias lácticas *Lactobacillus casei* ( ), *L. delbrueckii* ( ), *L. plantarum* (×), BNCCR5 ( ), CCA7 ( ) e CCA3 ( ) em caldo MRS, incubadas sob refrigeração.

O isolado CCA3 destacou-se por alcançar maior densidade ótica em menor período de incubação (Figura 3), principalmente a 5°C, e essa maior velocidade de crescimento é um fator importante a ser considerado na seleção da cultura a ser inoculada no produto minimamente processado, para inibir o crescimento de patógeno. Para BREIDT e FLEMING (1997), a taxa de crescimento de um biocontrole deve ser maior do que a do patógeno ressaltando, entretanto, que as taxas de produção de metabólitos inibitórios pelo biocontrole e a sensibilidade relativa do patógeno a estes metabólitos também afetarão o resultado competitivo entre as culturas.

As culturas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus casei* e os isolados CCA7 e BNCCR5 foram capazes de inibir *L. monocytogenes* somente a 15°C, enquanto o isolado CCA3 foi capaz de inibir o patógeno a 10 e 15°C (Figura 4) apresentando halos de inibição com diâmetros de 8,5 mm a 10°C e 5,5 mm a 15°C (Figura 5). Bactérias lácticas isoladas de outros alimentos minimamente processados apresentaram potencial de inibição de patógenos. VESCOVO et al. (1996) isolaram bactérias do ácido láctico psicrotróficas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus* spp.) de 22 amostras de saladas comerciais e essas estirpes inibiram *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* em ágar MRS, em saladas e em sucos de hortaliças. KELLY et al. (1996) obtiveram 22 isolados de bactérias lácticas produtoras de bacteriocina de 14 das 41 amostras de alimentos minimamente processados, incluindo carne, peixe, produtos de laticínio, frutas e hortaliças, que podem ser utilizadas como biocontrole em frutas e hortaliças minimamente processadas.



Figura 4: Inibição de *L. monocytogenes* por CCA3 em meio MRS incubado a 15°C (1) e 10°C (2).

Desses isolados, *Leuconostoc mesenteroides* KF80 e *Lactobacillus sake* KF52 foram capazes de inibir, “in vitro”, *L. monocytogenes*. KELLY et al. (1998) isolaram bactérias do ácido láctico de 76 frutas e hortaliças minimamente processadas e concluíram que espécies de *Lactococcus* são os principais componentes da microbiota encontrada nesses produtos durante o período de consumo, e que a ocorrência natural de produtores de bacteriocina contribui para a dominância dessas espécies.

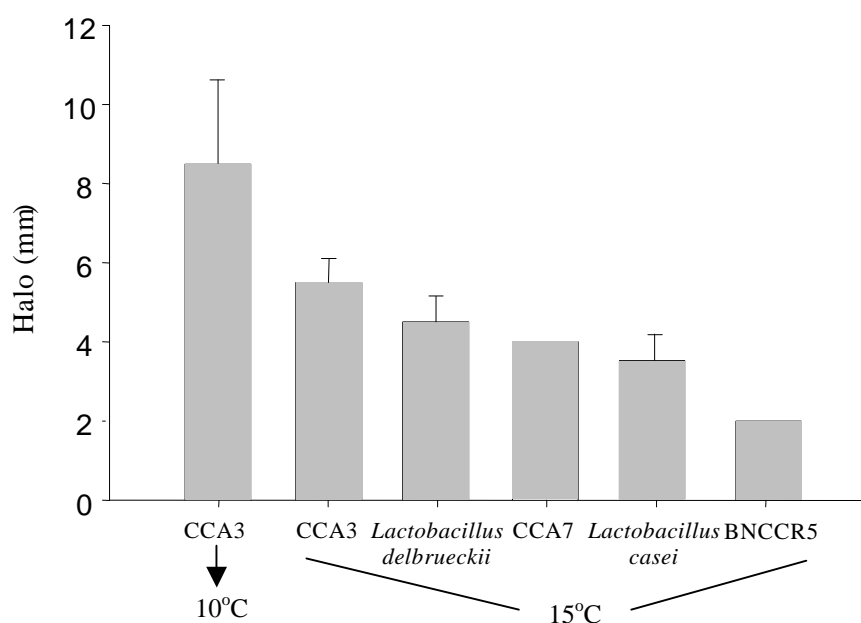


Figura 5: Medida (mm) do halo formado pela inibição de *L. monocytogenes* por bactérias lácticas “in vitro” sob refrigeração. Barras verticais representam o desvio padrão da média de duas repetições

#### 4.3. Crescimento de *L. monocytogenes* em couve minimamente processada na presença ou não da bactéria láctica com atividade antilistérica

A população de *L. monocytogenes* aumentou em 2,7 ciclos logarítmicos a 5°C e 2,8 ciclos logarítmicos a 10°C em couve minimamente processada armazenada sob atmosfera modificada passiva, após 20 dias de estocagem (Figura 6A e B). Em condição de abuso de temperatura, a 15°C, o aumento verificado foi de 4,6 ciclos logarítmicos, após oito dias de estocagem (Figura 6C).

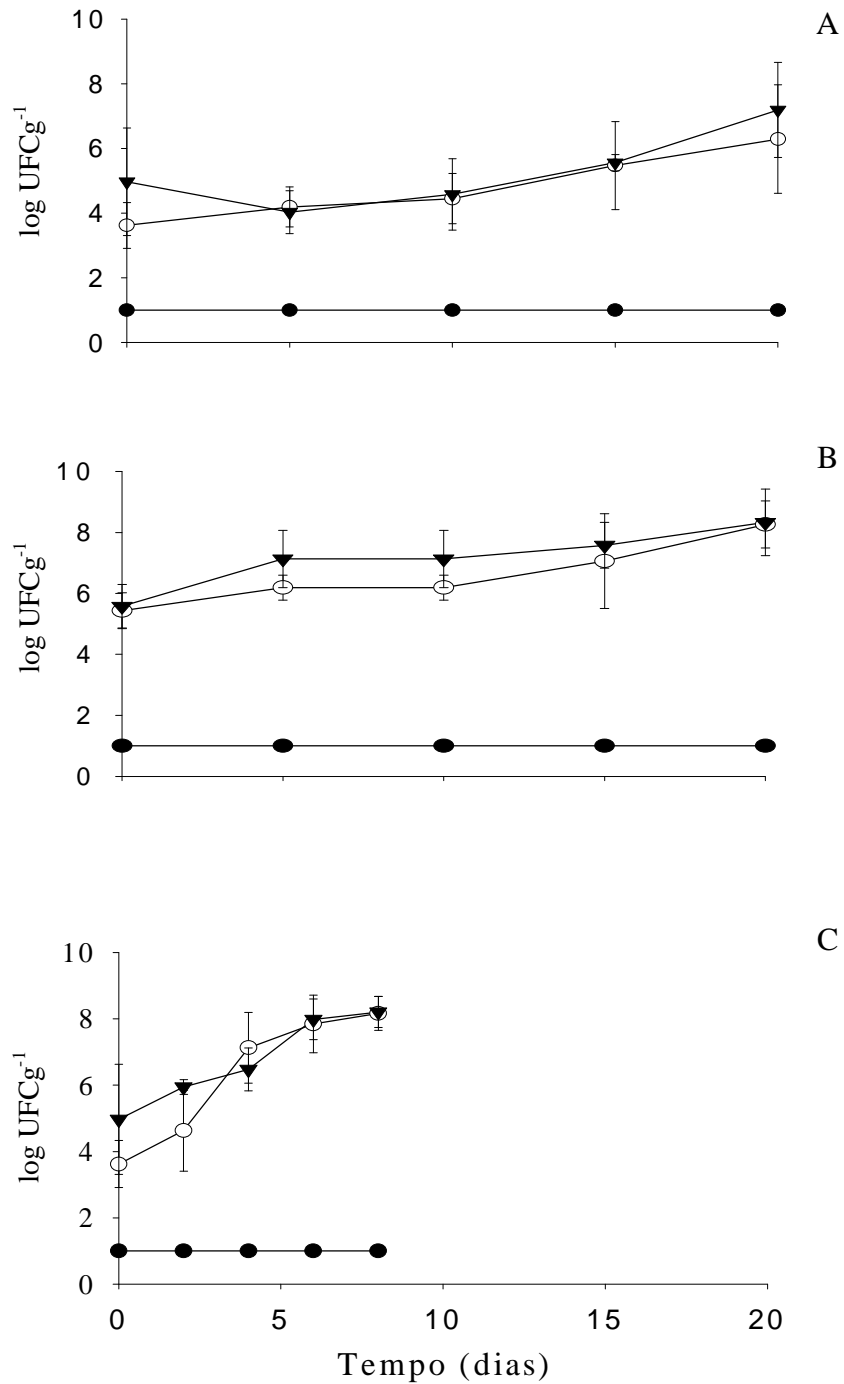


Figura 6: Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias ( $\text{UFCg}^{-1}$ ) de *L. monocytogenes* em couve minimamente processada estocada a 5 (A), 10 (B) e 15°C (C). Tratamento controle (●); produto inoculado com *L. monocytogenes* (○); produto inoculado com *L. monocytogenes* e CCA3 (▼). Barras verticais representam o IC a 95% de probabilidade (n=3).

Estes resultados reforçam o risco do crescimento desse patógeno psicrotrófico em alimentos minimamente processados e mantidos por períodos prolongados a temperaturas baixas, ou durante períodos de tempo menor, mas em temperaturas abusivas. A modificação passiva da atmosfera não inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* na couve minimamente processada. Nas mesmas condições experimentais, TELES (2000) observou que a concentração de oxigênio no interior da embalagem de poliolefina multicamada contendo couve minimamente processada armazenada foi de aproximadamente, 20% no tempo zero e reduziu rapidamente, atingindo concentrações de 3,6% a 5°C e 6,2% a 10°C. Nessas embalagens, a concentração de dióxido de carbono atingiu o estado de equilíbrio em concentrações de 2 a 2,7%. BENNIK et al. (1996) observaram que baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de dióxido de carbono, condições prevalentes em sistemas de embalagem sob atmosfera modificada, favoreceram seletivamente o crescimento de *L. monocytogenes* em chicória endívia minimamente processada. Esses autores verificaram que o uso de atmosfera modificada retardou o crescimento de microrganismos deterioradores durante o armazenamento a baixas temperaturas sem contudo, inibir o crescimento de *L. monocytogenes*.

A escolha da embalagem de poliolefina multicamada foi baseada nos resultados de CARNELOSSI (2000) e TELES (2000) que constataram ser essa embalagem a mais eficiente em manter a qualidade visual e nutricional da couve minimamente processada, com base nos teores de clorofila, carotenóides e vitamina C.

O crescimento de *L. monocytogenes* foi constatado em outras hortaliças minimamente processadas, armazenadas sob refrigeração. Em alface manteiga e endívia minimamente processadas, um aumento em torno de 1,5 ciclos logarítmicos foi observado durante o armazenamento a 10°C por 4 dias (CARLIN e NGUYEN-THI, 1994). Nessas mesmas condições de armazenamento, CARLIN et al. (1995) observaram um aumento máximo no número de *L. monocytogenes* de 2 ciclos logarítmicos em endívia minimamente processada. FARBER et al. (1998) verificaram um aumento em torno de 3 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* inoculada em hortaliças minimamente processadas armazenadas a 10°C por 9 dias. Em aspargos estocados a 2 e 4°C, *L. monocytogenes* não cresceu,

mas em três dias a 8°C, o aumento na população correspondeu a 2 ciclos logarítmicos, e a 12 e 20°C alcançou 4 ciclos logarítmicos (RODRÍGUEZ et al., 2000).

Durante o período de armazenamento a 5 e 10°C, houve um aumento expressivo da população de *L. monocytogenes* na couve minimamente processada após o décimo dia, alcançando 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> UFCg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 6A e B). No armazenamento da couve a 15°C, uma população de 10<sup>8</sup> UFCg<sup>-1</sup> foi alcançada no oitavo dia de estocagem (Figura 6C) .

O número inicial de *L. monocytogenes* inoculado em hortaliças minimamente processadas pode ter influência no crescimento, durante o período de armazenamento do produto. A concentração de *L. monocytogenes*, em amostras de couve minimamente processadas e estocadas a 10 e 15°C após 20 dias, atingiu 10<sup>8</sup> UFCg<sup>-1</sup>. Este resultado pode ser atribuído à alta concentração do inóculo (10<sup>5</sup> UFCg<sup>-1</sup>). CARLIN et al. (1995) verificaram que *L. monocytogenes* cresceu mais quando foi inoculada em valores de 10 a 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> em folhas de endívia minimamente processada, após quatro dias de armazenamento. Mesmo assim, a população final desse patógeno, após quatro e sete dias de armazenamento, foi significativamente menor (P<0,05) no produto contendo menor número de células iniciais em relação às folhas contendo os inóculos maiores.

*L. monocytogenes* cresceu a 5, 10 e 15°C em couve minimamente processada inoculada com o isolado CCA3 (Figura 6). Verificou-se que houve uma redução significativa (P<0,05) do valor da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) de *L. monocytogenes* no produto inoculado com o isolado CCA3 armazenado a 15°C (Quadro 3). Essa redução sugere uma atividade inibitória da cultura láctica. Observou-se também que, até o quarto dia, as características visuais típicas do produto foram mantidas. Este resultado permite sugerir que, em condições de abuso de temperatura, a presença de uma cultura láctica pode se constituir em uma barreira adicional para o crescimento de *L. monocytogenes* e, provavelmente, de outras bactérias indesejáveis.

Resultados similares foram obtidos por BENNIK et al. (1999) que avaliaram o potencial de duas estirpes de *Pediococcus parvulus* e uma estirpe de *Enterococcus mundtii*, ambas bacteriocinogênicas, isoladas de hortaliças minimamente

processadas, em controlar o crescimento de *L. monocytogenes* “in vitro” e em brotos de feijão frescos. Esses autores verificaram que as estirpes de *P. parvulus* não apresentaram atividade inibitória, “in vitro”, quando incubados a 4 ou 8°C, mas essa atividade foi evidenciada quando armazenados a 15 e 30°C, sugerindo que essas culturas podem ser utilizadas como biocontrole em produtos que são processados ou estocados em temperaturas elevadas. *E. mundtii* foi capaz de controlar o crescimento de *L. monocytogenes* apenas em ágar contendo extrato de brotos de feijão incubado por 5 dias a 8°C, mas não no produto armazenado sob atmosfera modificada na mesma temperatura.

Quadro 3: Média da velocidade específica de crescimento ( ) de *L. monocytogenes* na couve minimamente processada, mantida a 5, 10 e 15°C durante o período de armazenamento na ausência e presença de CCA3

Tratamentos	m de <i>L. monocytogenes</i>		
	5°C	10°C	15°C
<i>L. monocytogenes</i>	0,31 <sup>a</sup>	0,49a	1,27a
<i>L. monocytogenes</i> e CCA3	0,27 <sup>a</sup>	0,40a	0,99b

Médias seguidas de mesma letra verticalmente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

FRANCIS e O’BEIRNE (1998) encontraram uma redução de, no máximo, um ciclo logarítmico na população de *Listeria innocua* em um caldo de alface co-inoculado com *Leuconostoc citreum* ou *Lactobacillus brevis*, incubados a 8°C, por 21 dias. Uma efetividade mais acentuada de bactérias do ácido láctico em controlar o crescimento de microrganismos deterioradores ou patogênicos foi obtida por outros autores. VESCOVO et al. (1995) inocularam bactérias do ácido láctico em hortaliças minimamente processadas e as armazenaram por 8 dias a 8°C. Uma redução significativa na população de bactérias mesofílicas totais de, aproximadamente, cinco ciclos logarítmicos, foi observada durante o período de refrigeração e coliformes e enterococos foram inativados no produto no terceiro dia de armazenamento. VESCOVO et al. (1996) isolaram bactérias do ácido láctico de hortaliças frescas e essas culturas foram inoculadas em saladas mistas minimamente processadas. Esses autores verificaram que houve inativação dos patógenos *Aeromonas hydrophila*,

*Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* inoculados em até seis dias de armazenamento a 8°C, enquanto a concentração inicial de *L. monocytogenes* inoculada no produto permaneceu inalterada durante o período de armazenamento. BREIDT e FLEMING (1997) inocularam bactérias do ácido láctico e *L. monocytogenes* geneticamente marcadas em pepino, suco e em conserva, e observaram que não houve crescimento de *L. monocytogenes*, sendo este patógeno inibido, principalmente por bactérias lácticas naturalmente encontradas no produto.

Os resultados sugerem que contaminantes com potencial antilistéricos isolados de hortaliças podem agir como biocontrole para aumentar a segurança dos produtos minimamente processados.

#### **4.4. Contagens de bactérias lácticas e psicrotróficas aeróbias em amostras de couve minimamente processada estocadas a 5, 10 e 15°C**

A inoculação de, aproximadamente,  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> do isolado CCA3 na couve minimamente processada não afetou a aparência e odor característicos do produto. As amostras de couve, inoculadas ou não com o isolado CCA3 e armazenadas a 5°C, apresentaram características aceitáveis por até 15 dias, enquanto essas características foram observadas nas amostras de couve, estocadas a 10 e 15°C, por até 10 e 4 dias, respectivamente. Estes resultados se assemelham aos obtidos por BITTENCOURT (2000) em teste de aceitação de couve minimamente processada com grupos de 90 provadores não treinados, quando foi estimada uma vida útil de até 18 dias, para o produto mantido a 5°C. O produto a 10°C foi aceito quanto à aparência até o décimo dia, mas, no entanto, o aroma foi suficiente para promover sua rejeição no oitavo dia de armazenamento.

Durante o período de armazenamento da couve inoculada com o isolado CCA3, não houve um aumento expressivo na população de bactérias lácticas em nenhuma das temperaturas em estudo (Figura 7). Nas amostras não inoculadas com o isolado CCA3, a contagem de bactérias lácticas aumentou, aproximadamente, de 2,6 a 4,5 ciclos logarítmicos, a 10 e 15°C, respectivamente. No entanto a 5°C, o crescimento das bactérias lácticas foi de 1,8 ciclos logarítmicos nas amostras controle e de 2,5 ciclos logarítmicos nas amostras inoculadas apenas com *L. monocytogenes* (Figura 7).

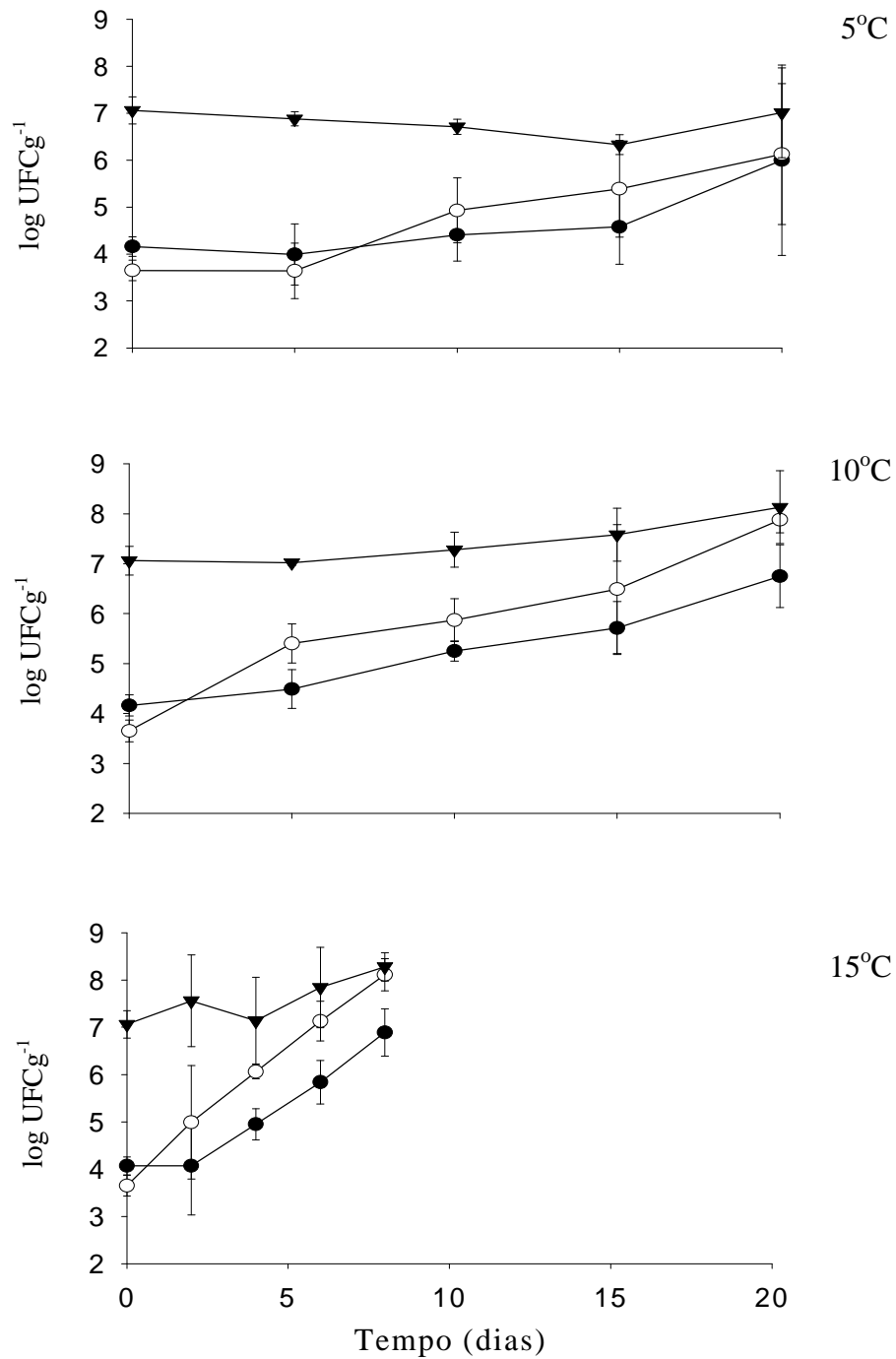


Figura 7: Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCg<sup>-1</sup>) de bactérias lácticas em couve minimamente processada estocada a 5, 10 e 15°C. Tratamento controle (○); produto inoculado com *L. monocytogenes* (●); produto inoculado com *L. monocytogenes* e CCA3 (▼). Barras verticais representam o IC a 95% de probabilidade (n=3).

O aumento da população de bactérias lácticas com o aumento da temperatura de armazenamento foi observado por outros autores. MANVELL e ACKLAND (1986) verificaram que a contagem de bactérias lácticas em hortaliças mistas embaladas e armazenadas a 7°C foi muito baixa, e constituiu uma pequena proporção da população total, enquanto que a 30°C, a população de bactéria láctica predominou no produto. BITTENCOURT (2000) verificou um aumento da população de bactérias lácticas, em couve minimamente processada, com o aumento da temperatura de armazenamento. O aumento verificado foi de 2,4 ciclos logarítmicos a 1°C, 4,0 a 5°C e 6,0 a 10°C.

A população de psicotróficos aeróbios (Figura 8) na couve minimamente processada armazenada a 5°C por 20 dias, aumentou 3,4 ciclos logarítmicos no tratamento controle, 4,6 ciclos logarítmicos no produto inoculado com *L. monocytogenes* e 4,4 ciclos logarítmicos no produto inoculado com *L. monocytogenes* e também com o isolado CCA3. No produto armazenado a 10°C, o aumento dessa população em ciclos logarítmicos, foi de 4,5; 4,9 e 5,3 no tratamento controle; no produto inoculado com *L. monocytogenes* e na presença do isolado CCA3, respectivamente. A população de psicotróficos aeróbios aumentou em 3,4; 4,7 e 5,7 ciclos logarítmicos no tratamento controle; no produto inoculado com *L. monocytogenes* e na presença do isolado CCA3, respectivamente, quando o produto foi armazenado a 15°C por 8 dias (Figura 8). Bactérias psicotróficas são agentes importantes de deterioração de hortaliças minimamente processadas e tem-se constatado que o crescimento dessa microbiota varia com o tipo de produto. BARRIGA et al. (1991) verificaram um aumento de 3 ciclos logarítmicos na população de microrganismos psicotróficos em alface minimamente processada estocada a 4°C por 12 dias sob atmosfera controlada com diferentes composições gasosas. FANTUZZI (1999) não observou variação do crescimento de psicotróficos quando as amostras de repolho minimamente processado foram estocadas a 1 e 5°C por 20 dias, mas a 12°C houve um crescimento dessa população de aproximadamente, 3 ciclos logarítmicos em 5 dias de armazenamento. BITTENCOURT (2000) verificou um aumento progressivo na contagem de psicotróficos em couve minimamente processada com o aumento da temperatura de

armazenamento, sendo de aproximadamente, 1, 3 e 4 ciclos logarítmicos quando estocados a 1, 5 e 10°C, respectivamente.

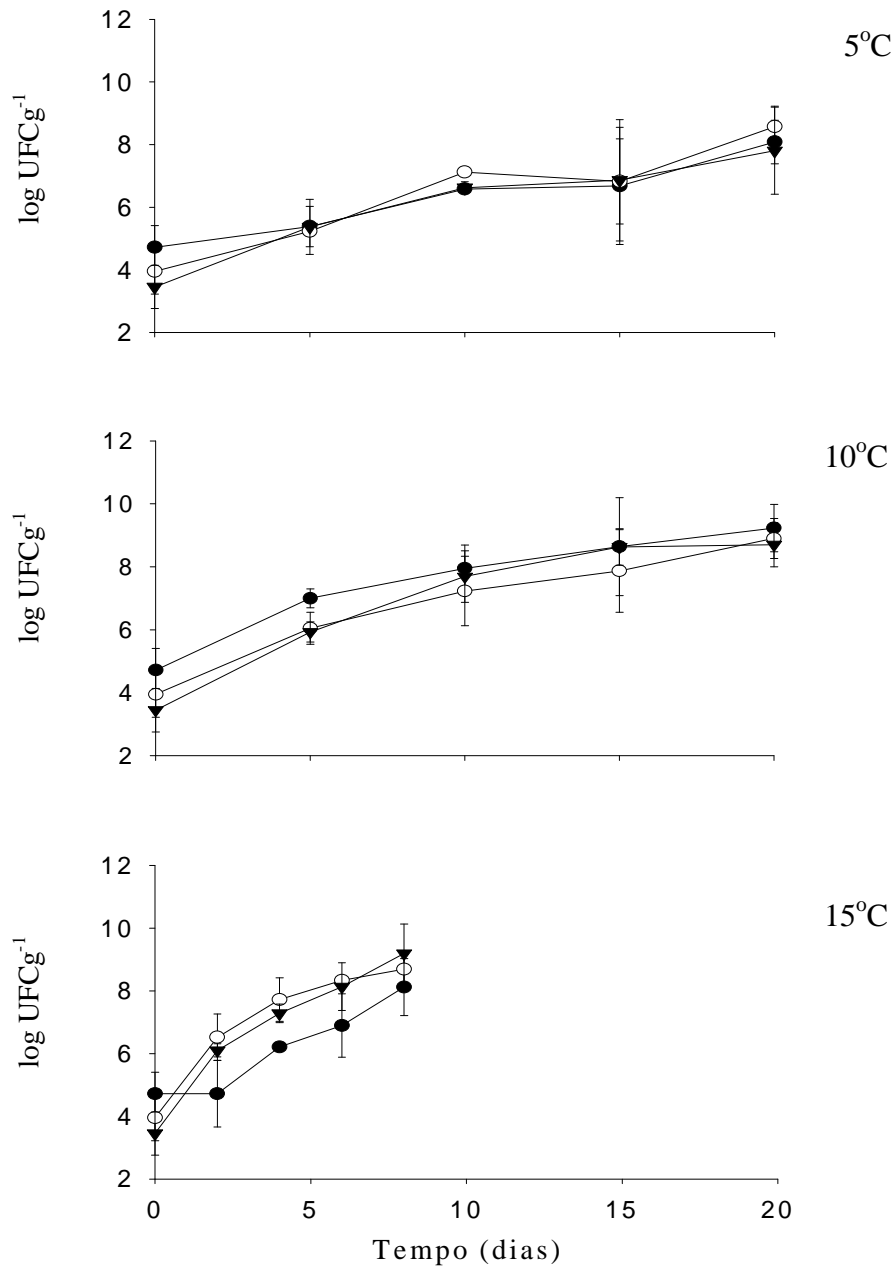


Figura 8: Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCg<sup>-1</sup>) de psicrotópicos aeróbios em couve minimamente processada estocada a 5, 10 e 15°C. Tratamento controle (○); produto inoculado com *L. monocytogenes* (●); produto inoculado com *L. monocytogenes* e CCA3 (▲). Barras verticais representam o IC a 95% de probabilidade (n=3).

Essa população predominou em todos os tempos de amostragem, sendo apontada como uma provável causa de deterioração do produto. Os dados dessa autora relacionados ao aumento da população de psicrotróficos em couve estocada a 5°C, coincidiram com os obtidos neste presente estudo em amostras do tratamento controle, de 3,4 ciclos logarítmicos.

A população de psicrotróficos nas amostras inoculadas com *L. monocytogenes* e com CCA3 foi maior em, aproximadamente, 1 ciclo logarítmico a 5 e 10°C e 2,3 ciclos logarítmicos a 15°C do que a encontrada no tratamento controle, provavelmente, em razão da inoculação dessas bactérias psicrotróficas.

#### **4.5. Acidez titulável em couve minimamente processada**

A acidez da couve minimamente processada variou em todos os tratamentos de, aproximadamente, 0,5 a 0,8 e não diferiu expressivamente nas temperaturas avaliadas durante o período de armazenamento (Figura 9).

MANVELL e ACKLAND (1986) determinaram a concentração de ácido láctico presente em hortaliças mistas armazenadas sob temperaturas de refrigeração e de abuso e observaram que em hortaliças armazenadas a 20, 25 e 30°C, a concentração de ácido láctico foi maior do que em hortaliças estocadas a 7°C. Nesta temperatura predominaram bactérias Gram-negativas.

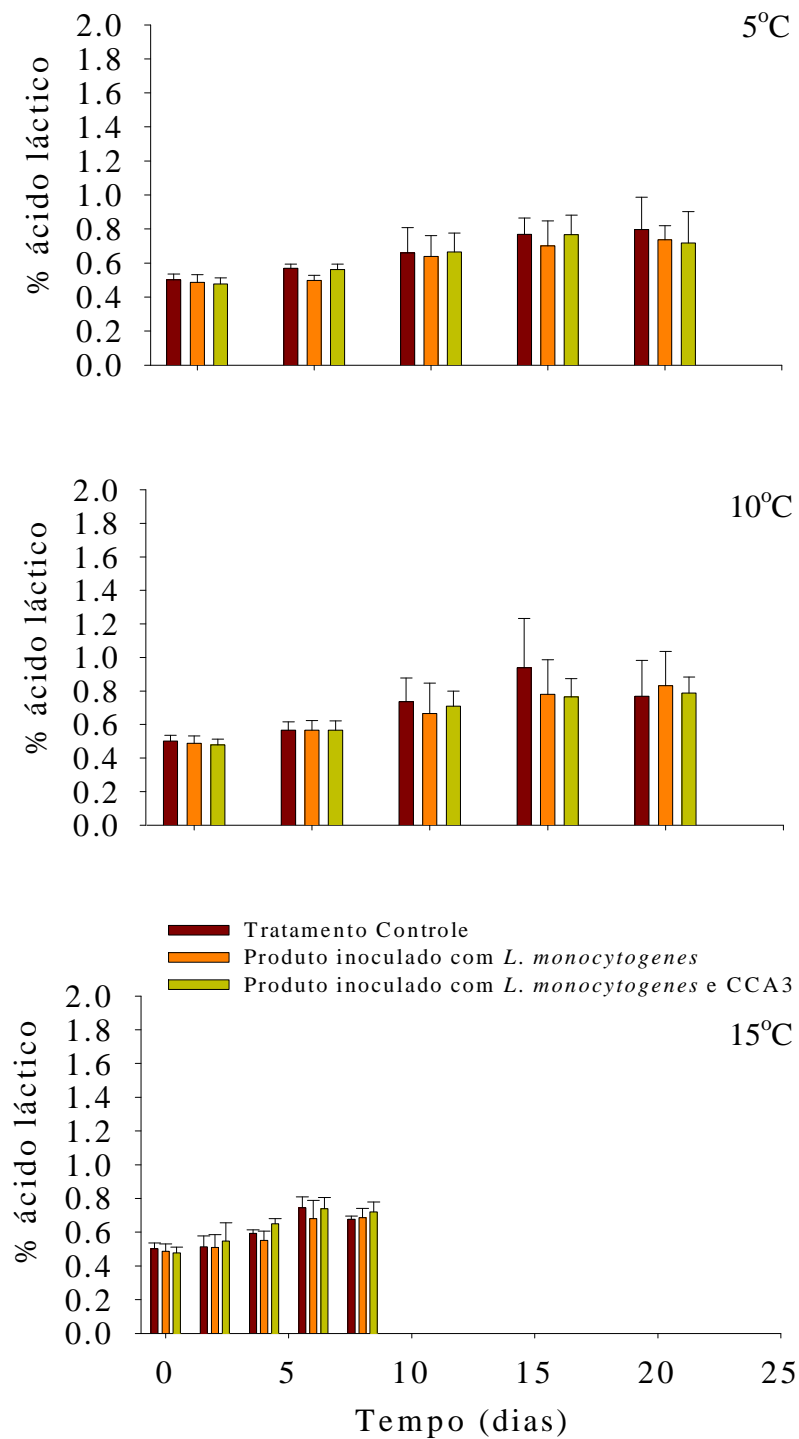


Figura 9: Acidez titulável expressa como concentração (%) de ácido láctico em amostras de couve minimamente processadas estocadas a 5, 10 e 15°C durante o período de armazenamento. Barras verticais representam o IC a 95% de probabilidade (n=3).

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de fatores inerentes ao processamento mínimo da couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*), tais como tempo de sanitização e tipos de sanitizantes, temperatura e tempo de estocagem e adição de bioconservante sobre o controle de *L. monocytogenes* inoculada no produto. Este estudo foi parte integrante de um projeto multidisciplinar para desenvolvimento de uma tecnologia apropriada ao processamento mínimo de hortaliças, adequada às condições brasileiras.

A sanitização da couve com clorado orgânico (Sumaveg<sup>®</sup>) e Sumaveg<sup>®</sup> + 1% de ácido láctico, reduziu, significativamente, a população de mesófilos aeróbios, não sendo detectada diferença significativa entre eles. A imersão do produto no agente sanitizante por 10, 20 ou 30 minutos não resultou em maior efeito sobre a microbiota contaminante e portanto, o tempo de 10 minutos foi adotado nos experimentos conduzidos posteriormente.

A imersão da couve fatiada por 10 minutos nas soluções sanitizantes de Sumaveg<sup>®</sup>, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, prata coloidal e extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* promoveu uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) no número de bactérias mesófilas aeróbias e *L. monocytogenes*, em relação ao controle em que a couve fatiada foi imersa apenas em água. Maior redução, correspondendo a, aproximadamente, 1,8 ciclos logarítmicos na população de mesófilos aeróbios, e 1,1 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* foi registrada quando utilizaram-se

ácido peracético e Sumaveg<sup>®</sup>, respectivamente. Os sanitizantes Sumaveg<sup>®</sup>, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, e extrato hidroalcolico de *S. officinalis* reduziram a população de *L. monocytogenes* em valores de 1,1; 1,0; 0,9 e 0,7 ciclos logarítmicos, respectivamente. Considerando-se que não houve diferença significativa entre os quatro sanitizantes citados, optou-se por utilizar, no processamento mínimo da couve, o Sumaveg<sup>®</sup>.

Com o objetivo de selecionar bactérias lácticas que apresentassem atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* nas condições de refrigeração adotadas no armazenamento de couve minimamente processada, foram avaliadas as culturas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* e *Lactobacillus plantarum*, além de isolados de couve denominados de CCA3, BNCCR5 e CCA7. O isolado CCA3 apresentou o melhor crescimento nas temperaturas de 5, 10 e 15°C e também o maior halo de inibição de *L. monocytogenes*, com uma média de 8,5 e 5,5 mm a 10 e 15°C, respectivamente. O isolado CCA3 foi selecionado para avaliar o potencial como bioconservante em couve minimamente processada, para controlar o crescimento de *L. monocytogenes* inoculada no produto.

O crescimento das bactérias *L. monocytogenes*, lácticas e de psicrotróficos aeróbios, na couve minimamente processada acondicionada em embalagens de poliolefina multicamada 21 µm, de 18 x 11,25 cm e com a modificação passiva da atmosfera, foi acompanhado durante o armazenamento a 5 e 10°C por 20 dias e a 15°C por 8 dias.

*L. monocytogenes* cresceu a 5, 10 e 15°C em couve minimamente processada inoculada com o isolado CCA3. A redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos valores de velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) de *L. monocytogenes* no produto inoculado com o isolado CCA3 armazenado a 15°C, sugere uma atividade inibitória da cultura láctica. Nessa mesma condição, foi observada manutenção das características visuais do produto até o quarto dia de armazenamento.

A população de bactérias lácticas manteve-se em torno de  $10^7$  a  $10^8$  UFCg<sup>-1</sup> nos tratamentos onde a couve foi inoculada com a cultura CCA3 e armazenada a 5, 10 e 15°C. Entretanto, houve um aumento expressivo da população de bactérias lácticas nas amostras controle de 2,6 e 4,2 ciclos logarítmicos e nas inoculadas com *L. monocytogenes* de 2,8 e 4,5 ciclos logarítmicos a 10 e 15°C, respectivamente. A

5°C, o crescimento dessa microbiota foi menos acentuado, com aumentos de 1,8 ciclos logarítmicos no tratamento controle e de 2,5 ciclos logarítmicos no produto inoculado com *L. monocytogenes*.

A população de psicrotróficos aeróbios aumentou na couve minimamente processada armazenada a 5 e 10°C, aproximadamente, em 3,4 a 4,6 e 4,5 a 5,3 ciclos logarítmicos, respectivamente, por 20 dias. Nos produtos armazenados a 15°C por oito dias, o aumento dessa população foi de 3,4 a 5,7 ciclos logarítmicos.

Não houve diferença expressiva quanto à porcentagem de ácido láctico na couve minimamente processada nos diferentes tratamentos avaliados, nem entre as temperaturas de estocagem do produto.

Observações das características visuais e do odor mostraram que a couve minimamente processada conservou melhor e por mais tempo quando armazenada a 5°C.

Pode-se sugerir que contaminantes com potencial antilistérico isolados de hortaliças podem agir como biocontrole para aumentar a segurança dos minimamente processados. Mas, para o sucesso desse efeito antagonista, deve-se avaliar um maior número de isolados, principalmente “in situ”, levando-se em consideração os fatores ambientais, e selecionar os que obtiverem maior inibição ao patógeno na hortaliça em estudo. No entanto, esse controle é adicional, ou seja, não deverá substituir as boas práticas de manipulação do produto durante todo o processamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. R., HARTLEY, A. D. e COX, L. J. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in production of prepared salads. **Food Microbiology**, v. 6, p. 69-77, 1989
- AHVENAINEN, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 179-187, 1996
- AKIYAMA, H., YAMASAKI, O., KANZAKI, H., TADA, J. e ARATA, J. Effects of sucrose and silver on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 629-634, 1998
- BARA, M. T. F. e VANETTI, M. C. D. Antimicrobial effect of spices on the growth of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 3, n. 4, p. 51-58, 1995
- BARRIGA, M. I., TRACHY, G., WILLEMOT, C. e SIMARD, R. E. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1586-1599, 1991
- BEAULIEU, J. C., OLIVEIRA, F. A. R., FERNANDES, T. D., FONSECA, S. C. e BRECHT, J. K. Fresh-cut kale: quality assessment of portuguese store-supplied product for development of a MAP system. **CA'97**, Proceedings, Postharvest Horticulture Series, v. 5, n. 19, p. 145-151, 1997
- BENNIK, M. H. J., PEPPELENBOS, H. W., NGUYEN-THE, C., CARLIN, F., SMID, E. J. e GORRIS, L. G. M. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 209-221, 1996

- BENNIK, M. H., van OVERBEEK, W., SMID, E. J. e GORRIS, L. G. Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 226-232, 1999
- BEUCHAT, L. O. R. e BRACKET, R. E. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 33, p. 755-758, 1990
- BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 2, p. 204-216, 1995
- BEUCHAT, L. R., NAIL, B. V., ADLER, B. B., CLAVERO, M. R. S. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1305-1311, 1998
- BITTENCOURT, M. T. **Atividade microbiana em couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) minimamente processada**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 76p. Dissertação, (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2000
- BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 999-1003, 1987
- BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 10, p. 808-814, 1992
- BRASIL. **Resolução RDC nº. 12 de 2 de janeiro de 2001**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, Seção 1.- 10 de janeiro de 2001
- BRECHT, J. K. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, v. 30, n. 1, p. 18-21, 1995
- BREIDT, F. e FLEMING, H. P. Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 51, n. 9, p. 44-51, 1997
- CARLIN, F. e NGUYEN-THE. Fate of *Listeria monocytogenes* on four types of minimally processed green salads. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p. 222-226, 1994

- CARLIN, F., NGUYEN-THE, C. e da SILVA, A. A. Factors affecting the growth of *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh endive. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 636-646, 1995
- CARNELOSSI, M. A. G. **Fisiologia pós-colheita de folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) minimamente processadas**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 79p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2000
- CASE, R. A, BRADLEY, R. L. e WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: RICHARDSON, G. H. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15 th edition, American Public Health Association, Washington, D.C., p. 327-404, 1985
- CENCI, S. A. Pesquisa em processamento mínimo de hortaliças no Brasil. **II Encontro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças – Palestras**, p. 110-116, 8-10 de nov. 2000, Universidade Federal de Viçosa – MG
- CHERRY, J. P. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. **Food Technology**, v. 53, n. 11, p. 54-59, 1999
- CHOI, Y., CHO, S., PARK, B., CHUNG, D. e OH, D. Incidence and characterization of *Listeria* spp. from foods available in Korea. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 554-558, 2001
- DANTAS, M. I. S. **Impacto da embalagem de couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) minimamente processada na intenção de compra do consumidor**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 77p. Dissertação, (Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2001
- DE SOUZA, R. A. M. Perspectivas do mercado de frutas e hortaliças minimamente processadas. **II Encontro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças – Palestras**, p. 1-22, 8-10 de nov. 2000, Universidade Federal de Viçosa – MG
- EL-KEST, S. E. E MARTH, E. H. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by chlorine. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 7, p. 520-524, 1988
- FANTUZZI, E. **Atividade microbiana em repolho (*Brassica oleraceae* cv. *capitata*) minimamente processado**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 50p. Dissertação, (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1999
- FARBER, J. M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology – A review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 1, p. 58-70, 1991
- FARBER, J. M., WANG, S. L., CAI, Y. e ZHANG, S. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 2, p. 192-195, 1998

- FERRERES, F., GIL, M. I., CASTAÑER, M. e TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4249-4254, 1997
- FOEGEDING, P. M. e BUSTA, F. F. Chemical food preservatives. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization, and preservation**, fourth edition, Philadelphia-London:Lea & Febiger, p. 802-832, 1991
- FRANCIS, G. A. e O'BEIRNE, D. Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 141-151, 1997
- FRANCIS, G. A. e O'BEIRNE, D. Effects of the indigenous microflora of minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 477-488, 1998
- GELLIN, B. G., e BROOME, C. V. Listeriosis. **Journal of American Medical Association**. V. 261, p. 1313-1320, 1989
- GIL, M. I., ARTES, F. e TOMAS-BARBERAN, F. A. Minimally processing and modified atmosphere packaging effects on pigmentation of pomegranate seeds. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1. P. 161-164, 1996
- GIOMBELLI, A. **Virulência de *Listeria monocytogenes* isolada de ambientes de laticínios, de alimentos e de humanos**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 49p. Dissertação, (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2000
- GUERZONI, M. E., GIANOTTI, A., CORBO, M. R. e SINIGAGLIA, M. Shelf-life modeling for fresh-cut vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 195-207, 1996
- HAO, Y. Y., BRACKETT, R. E. e DOYLE, M. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 307-312, 1998
- HARRIS, L. J., DAESCHEL, M. A., STILES, M. E. e KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 6, p. 384-387, 1989
- HILGREN, J. D. e SALVERDA, J. A. Antimicrobial efficacy of a peroxyacetic/octanoic acid mixture in fresh-cut-vegetable process waters. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1376-1379, 2000

- HOLZAPFEL, W. H., GEISEN, R. E SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995
- HUXSOLL, C. C. e BOLIN, H. R. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 49, n. 32, p. 124-128, 1989
- KADER, A. A. e BEN-YEHOSHUA, S. Effects of superatmospheric oxygen levels on postharvest physiology and quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 1-13, 2000
- KELLY, W. J., ASMUNDSON, R. V. e HUANG, C. M. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 209-218, 1996
- KELLY, W. J., DAVEY, G. P. e WARD, L. J. H. Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruit and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 85-92, 1998
- KIM, J., MARSHALL, M. R. e WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1995
- KIM, K. Y., VIDSON, M. D. e CHUNG, H. J. Antibacterial activity in extracts of *Camellia japonica* L. petals and its application to a model food system. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1255-1260, 2001
- MANVELL, P. M. e ACKLAND, M. R. Rapid detection of microbial growth in vegetable salads at chill and abuse temperatures. **Food Microbiology**, v. 3, p. 59-65, 1986
- MARTH, E. H. Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. **Food Technology**, v. 52, n. 2, p. 57-62, 1998
- MORETTI, C. L. Tecnologia de produtos minimamente processados. **XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**, Foz do Iguaçu, PR, 5 p., Agosto de 2001
- NGUYEN-THE, C. e CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 371-401, 1994
- NORRUNG, B., ANDERSEN, J. K. e SCHLUNDT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 195-203, 1999

- NORRUNG, B. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 217-221, 2000
- ODUMERU, J. A., MITCHELL, S. J., ALVES, D. M., LYNCH, J. A., YEE, A. J., WANG, S. L., STYLIADIS, S. e FARBER, J. M. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 8, p. 954-960, 1997
- PANDIT, V. A. e SHELEF, L. A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v. 11, p. 57-63, 1994
- RODRÍGUEZ, A. M. C., ALCALÁ, E. B., GIMENO, R. M. G. E COSANO, G. Z. Growth modelling of *Listeria monocytogenes* in packaged fresh green asparagus. **Food Microbiology**, v. 17, p. 421-427, 2000
- ROLLE, R. S. e CHISM, G. W. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, v. 10, p. 157-177, 1987
- ROSA, M. de C., FARIA, O. de, AMANTE, E. R. O Padrão respiratório na estocagem de produtos vegetais – Uma revisão. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 2, p. 207-214, 1999
- SAABOR, A. Os pré-processados e os orgânicos no mercado varejista paulista. **Congresso Brasileiro de Olericultura**, Brasília – DF, 23/07/2001
- SAPERS, G. M. e SIMMONS, G. F. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 52, n. 2, p. 48-52, 1998
- SCHLIMME, D. V. e ROONEY, M. L. Packaging of minimally processed fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**, New York – London: Chapman & Hall, p. 135-182, 1994
- SIMONETTI, N., SIMONETTI, G., BOUGNOL, F. e SCALZO, M. Electrochemical Ag<sup>+</sup> for preservative use. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3834-3836, 1992
- SIMONS, L. K. e SANGUANSRI, P. Advances in the washing of minimally processed vegetables. **Food Australia**, v. 49, n. 2, p. 75-80, 1997
- SINGH, N., SINGH, R. K., BHUNIA, A. K. e STROSHINE, R. L. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. **Food Microbiology**, v. 19, p. 183-193, 2002
- SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., e HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, p. 1229-1230, 1986

- SORIANO, J. M., RICO, H., MOLTÓ, J. C. e MAÑES, J. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 4, p. 551-553, 2001
- SPELHAUG, S. R. e HARLANDER, S. K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Protection**, v. 52, p.856-862, 1989
- TASHTOUSH, B. Natural losses from vegetable and fruit products in cold storage. **Food Control**, v. 11, p. 465-470, 2000
- TELES, C. S. **Avaliação física, química e sensorial de couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) minimamente processada, armazenada sob atmosfera modificada**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 115p. Dissertação, (Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000
- THOMAS, C. e O´BEIRNE, D. Evaluation of the impact of short-term temperature abuse on the microbiology and shelf life of a model ready-to-use vegetable combination product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 47-57, 2000
- VEDAMUTHU, E. R., RACCACH, M., GLATZ, B. A., SEITZ, E. W. e REDDY, M. S. Acid-producing microorganisms. In:VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, 3<sup>a</sup> ed., American Public Health Association, p. 225-238, 1992
- VESCOVO, M., ORSI, C., SCOLARI, G. e TORRIANI, S. Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on microflora associated with ready-to-use vegetables. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 121-125, 1995
- VESCOVO, M., TORRIANI, S., ORSI, C., MACCHIAROLO, F. e SCOLARI, G. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 113-119, 1996
- VORTEXX [S.I.]: 1999 (Informativo técnico)
- WATADA, A. E. e QI, L. Quality of fresh-cut produce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 201-205, 1999
- WILEY, R. C. Introduction to minimally processed refrigerated fruits and vegetables. **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**, New York – London: Chapman & Hall, p. 1-14, 1994

YILDIZ, F. Initial preparation, handling, and distribution of minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**, New York – London: Chapman & Hall, p. 15-65, 1994

ZHANG, S. e FARBER, J. M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, v. 13, p. 311-321, 1996