UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Conservação de espinafre (*Tetragonia expansa*) pelo emprego de radiação gama: aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais

Ana Carolina Bortolossi Rezende

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador (a):
Profa. Dra. Mariza Landgraf

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Conservação de espinafre (*Tetragonia expansa*) pelo emprego de radiação gama: aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Ana Carolina Bortolossi Rezende

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Mariza Landgraf

São Paulo
2013

Ana Carolina Bortolossi Rezende

Conservação de espinafre (*Tetragonia expansa*) pelo emprego de radiação gama: aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Mariza Landgraf
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedicatória

*Aos meus pais, que sempre torceram e
acreditaram em mim, pois sem eles nada teria
sido possível.*

*Ao meu noivo pela paciência, carinho e pelo
apoio em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e sabedoria, principalmente nos momentos de desafios.

À Profa. Dra. Mariza Landgraf, pela oportunidade, confiança, paciência e orientação.

À Profa. Dra. Maria Teresa Destro, pelo convívio e pelas sugestões.

À Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pelo convívio.

À profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto e à aluna Ana Carolina Rapacci Llorca pela realização das análises de flavonoides, compostos fenólicos e capacidade antioxidante e pela pronta disponibilidade em ajudar.

À Profa. Dra. Inar Alves de Castro pela atenção e orientação na elaboração e desenvolvimento da análise sensorial e análise instrumental de cor.

À Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi pela atenção e execução das análises de vitamina C.

À Lucia Helena Justino dos Santos pela colaboração na execução das análises de vitamina C.

À minha família pelo carinho e apoio, especialmente meus pais Marta e Maury, meu irmão Felipe e meu sobrinho Guilherme.

Ao meu noivo Roberto, pelo amor, apoio, carinho e paciência durante os momentos difíceis.

À minha prima Maira Rezende pela atenção, apoio e troca de experiência.

Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre torceram por mim.

Às minhas avós Nilza e Maria de Lourdes, pelo amor, carinho e muitas orações.

A todos os meus amigos que mesmo distante estiveram torcendo por mim.

Aos amigos que ganhei e sempre levarei comigo Adriana, Aline e Rafael, pela amizade, companheirismo, ajuda, pelos esclarecimentos e pelos momentos de alegrias.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Maria Crystina, Thaisla, Daniele, Fabiana, Verena, Janaina, Rita, Priscila C., Priscila A., Maria Fernanda, Vinícius, Patricia, Isabela, Anderson, Vanessa, Matheus, Haissa, Katia e Lucia pela amizade e colaboração.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial ao Paulo Souza Santos pela disponibilidade e irradiação das amostras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo.

À Monica, Cleonice, Roberta e Edilson da secretaria do departamento pelos serviços prestados.

À Mirian e ao Jorge da secretaria de Pós-Graduação, pelos serviços prestados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Muito obrigada!!!

RESUMO

REZENDE, A.C.B. **Conservação de espinafre (*Tetragonia expansa*) pelo emprego de radiação gama: aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais**. 2013. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Nos últimos anos, vegetais têm sido responsáveis por surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) em diversas regiões do mundo por serem veículos dos mais diferentes micro-organismos patogênicos, entre eles *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC). O uso de sanitizantes nem sempre reduz de maneira significativa a população de micro-organismos presentes nos vegetais, sendo necessária a aplicação de técnicas mais eficientes, entre elas, a radiação gama. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da irradiação na redução de STEC, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* inoculadas em espinafre minimamente processado, bem como sobre os atributos físico-químicos e sensoriais do vegetal. Amostras de espinafre (*Tetragonia expansa*) foram inoculadas com um “pool” de cepas de *Salmonella* spp, um “pool” de cepas de *L. monocytogenes* e um “pool” de cepas de STEC, separadamente, e expostas às doses de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 kGy. Os valores de D_{10} para *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* e STEC foram, respectivamente, 0,19 a 0,20 kGy, 0,20 a 0,21 kGy e 0,17 kGy. Foram avaliados os comportamentos de *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* e STEC em amostras de espinafre expostas à doses cinco vezes maiores do que o valor D_{10} obtido para cada micro-organismo: 1,0; 1,05 e 0,85 kGy, respectivamente, e em amostras não irradiadas armazenadas por 12 dias a $(4\pm1)^\circ\text{C}$ e a $(10\pm1)^\circ\text{C}$. Os resultados mostram que as doses empregadas reduziram a população de *Salmonella* e de STEC em aproximadamente 6 ciclos log no dia zero tendo permanecido abaixo do limite de detecção (<10 UFC/g), mesmo após 12 dias de armazenamento em ambas as temperaturas. A dose de 1,05 kGy reduziu a população de *L. monocytogenes* em, aproximadamente, 5 log imediatamente após a irradiação, porém com recuperação de 2,62 log nas amostras armazenadas a $(10\pm1)^\circ\text{C}$ ao final do período de armazenamento. Amostras de espinafre expostas às doses de 1 e 1,5 kGy e a amostra-controle, mantidas sob refrigeração $(4\pm1)^\circ\text{C}$, foram utilizadas para a avaliação da vida de

prateleira (VP), análise sensorial, análise de cor, determinação de ácido ascórbico, flavonoides, compostos fenólicos e capacidade antioxidante. A VP da amostra exposta à dose de 1 kGy foi de 15 dias, dois dias a mais que a da amostra-controle, enquanto a exposta a 1,5 kGy apresentou VP de 12 dias. Todas as amostras expostas à radiação foram aceitas pelos provadores. A irradiação não provocou alterações significativas na concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante, porém houve alteração na cor e na concentração de flavonoides. As estações do ano, por sua vez, tiveram influência sobre a coloração, concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Apesar da alteração na coloração ter sido observada na análise instrumental, esta não foi percebida pelos provadores durante a análise sensorial. O processo de irradiação mostrou ser uma boa alternativa para aumentar a segurança microbiológica de espinafre sem alterar as características sensoriais. No entanto, o uso das Boas Práticas de Fabricação nunca deve ser negligenciado.

Palavras-chave: Irradiação de alimentos, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, espinafre.

ABSTRACT

REZENDE, A.C.B. **Preservation of spinach (*Tetragonia expansa*) using gamma radiation: physical chemical, microbiological and sensorial characteristics.** 2013. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

In recent years, fresh produce have been responsible for foodborne disease outbreaks worldwide, due to their contamination by different pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). The use of sanitizers does not always significantly reduce the microbial populations present in vegetables, and thus, the application of more efficient techniques such as gamma radiation, is required. The objectives of this study were to evaluate the effect of irradiation on the reduction of the populations of STEC, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*, inoculated on minimally processed spinach, as well as to assess its effect on the sensory and physicochemical characteristics of the vegetable. Spinach (*Tetragonia expansa*) samples were individually inoculated, with a cocktail of three strains of *Salmonella* spp, three strains of *L. monocytogenes* and three strains of STEC and exposed to doses of 0, 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 kGy. The D₁₀ values determined in this study ranged from 0.19 to 0.20 kGy for *Salmonella* spp, 0.20 to 0.21 kGy for *L. monocytogenes*, and 0.17 kGy for STEC. The behavior of *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and STEC were evaluated in spinach samples exposed to doses of 1.0, 1.05 and 0.85 kGy, respectively, and in non-irradiated samples, stored for 12 days at (4±1) °C and (10±1) °C. The results showed that the populations of *Salmonella* and STEC were reduced at about 6 log, on day zero, and remained below the detection limit (<10 CFU/g) even after 12 days of storage at both temperatures tested. The 1.05 kGy dose reduced the population of *L. monocytogenes* in approximately 5 log, but in the samples stored at (10±1) °C, the growth of the microorganism (2,62 log) was observed at the end of the storage time. Spinach samples exposed to 1 and 1.5 kGy, as well as the control sample, all kept under refrigeration (4±1) °C were used for the evaluation of the product shelf life, sensory analysis, color analysis, determination of ascorbic acid, flavonoids, phenolic compounds and the antioxidant capacity. The samples exposed to 1 kGy displayed a shelf life of 15 days, two days longer than that observed for the control sample, while

those exposed to 1.5 kGy showed a shelf life of 12 days. All samples exposed to radiation were accepted by the sensorial panel. The irradiation had no significant effect either on the concentration of phenolic compounds or on the antioxidant activity. Nevertheless, there was a reduction in the concentration of flavonoids and change on the color. The color, phenolic compounds concentration and antioxidant activity were influenced by the seasons of the year. Although the change in color was observed by instrumental analysis, this was not perceived by the panelists during sensory analysis. The irradiation process is a great alternative for microbiological safety purpose together with Good Manufacturing Practices.

Keywords: Food irradiation, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, spinach.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de ficha utilizada no teste de aceitação de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) minimamente processado e irradiado _____	39
Figura 2 – Apresentação das amostras para o teste de aceitação _____	40
Figura 3 – Sobrevivência de <i>Salmonella</i> spp. inoculada em espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) e exposta a diferentes doses de radiação _	48
Figura 4 – Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> inoculada em espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) e exposta a diferentes doses de radiação _	49
Figura 5 – Sobrevivência de <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga inoculada em espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) e exposta a diferentes doses de radiação _____	50
Figura 6 – Representação de coordenada do sistema L*, a* e b* para avaliação de cor instrumental (KONIKA MINOLTA, 1994)._____	61
Figura 7 – Médias de L* por dia, entre os três tratamentos, durante as quatro estações do ano._____	63
Figura 8 – Médias de a* por dia, entre os três tratamentos, durante as quatro estações do ano._____	65
Figura 9 – Médias de b* por dia, entre os três tratamentos, durante as quatro estações do ano._____	67
Figura 10 – Estrutura dos flavonoides encontrados no espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>). _____	72
Figura 11 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD (328 nm) de amostra de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>). (A) fração eluída com metanol após SPE e (B) fração eluída com metanol amônia após SPE. Picos identificados como (1) derivados do ácido hidroxicinâmico, (2) derivados de apigenina, (3) derivado de luteolina. _____	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente de solventes para eluição dos compostos fenólicos ____	44
Tabela 2 – Comportamento de <i>Salmonella</i> spp (log UFC/g) inoculada em espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) minimamente processado e exposto a radiação gama, durante o armazenamento a (4±1) °C e a (10±1) °C até 12 dias. _____	51
Tabela 3 – Comportamento de STEC (log UFC/g) inoculada em espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) minimamente processado e exposto a radiação gama, durante o armazenamento a (4±1) °C e a (10±1) °C até 12 dias _____	52
Tabela 4 – Comportamento de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) inoculada em espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) minimamente processado e exposto a radiação gama, durante o armazenamento a (4±1) °C e a (10±1) °C até 12 dias. _____	53
Tabela 5 – Médias das notas atribuídas à aparência, aroma, sabor e textura das amostras de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>). * _____	56
Tabela 6 – Avaliação microbiológica das amostras de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) minimamente processado e irradiado durante vida de prateleira _____	59
Tabela 7 – Valores de Luminosidade (L*) para as folhas de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) irradiado a diferentes doses armazenado a (4±1) °C por 12 dias*. _____	62
Tabela 8 – Valores de a* para as folhas de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) irradiado a diferentes doses e armazenado a (4±1) °C por 12 dias*. _____	64

Tabela 9 – Valores de b* para as folhas de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) irradiado a diferentes doses e armazenado a (4±1) °C por 12 dias*. _____	66
Tabela 10 – Teor de Fenólicos totais (mg ácido gálico eq./100 g b.u.) em amostra de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) submetido a tratamento por irradiação, nas quatro estações do ano de 2012._	70
Tabela 11 – Capacidade antioxidante (μmol Trolox eq./100 g b.u.) em amostra de espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) submetido a tratamento por irradiação, nas quatro estações do ano de 2012. _____	71
Tabela 12 – Concentração de flavonoides (mg/100 g bu) e derivados do ácido hidroxicinâmico (mg ácido clorogênico eq./100 g bu). Amostragem, outono 2012. _____	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga – características e importância	18
1.2. <i>Salmonella</i> spp. – características e importância	20
1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> – características e importância	23
1.4. Irradiação de alimentos	25
1.5. Compostos Fenólicos	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Resistência de <i>Salmonella</i> spp, <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC) e <i>Listeria monocytogenes</i> em espinafre irradiado	31
3.1.1. Material	31
3.1.1.1. Amostras	31
3.1.1.2 Cepas utilizadas	31
3.1.2 Métodos	32
3.1.2.1 Preparo das amostras para inoculação	32
3.1.2.2 Preparo do inóculo dos micro-organismos: <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC) e <i>L. monocytogenes</i> (KANG; FUNG, 1999, com modificações)	32
3.1.2.2.1. <i>Salmonella</i> spp.	32
3.1.2.2.2. STEC	33
3.1.2.2.3. <i>L. monocytogenes</i>	33
3.1.3 Contaminação laboratorial de espinafre com <i>Salmonella</i> spp, STEC e <i>L. monocytogenes</i>	34
3.1.4. Processo de Irradiação	34
3.1.5 Enumeração de <i>Salmonella</i> spp., STEC e <i>Listeria monocytogenes</i>	35
3.1.6. Cálculo do valor D ₁₀	35

3.1.7 Avaliação do efeito da radiação gama no comportamento de <i>Salmonella</i> , STEC e <i>L. monocytogenes</i> inoculadas em espinafre, armazenados a (4±1) °C e a (10±1)°C por 12 dias _____	36
3.1.7.1. Preparo do inóculo _____	36
3.1.7.2. Contaminação laboratorial dos vegetais para a avaliação do comportamento de <i>Salmonella</i> spp, STEC e <i>L. monocytogenes</i> _____	36
3.1.7.3. Irradiação das amostras _____	36
3.1.7.4. Enumeração da população sobrevivente de <i>Salmonella</i> spp., STEC e <i>L. monocytogenes</i> (KANG; FUNG, 1999, com modificações) _____	37
3.2. Estudo de Vida de Prateleira de espinafre minimamente processado submetido à radiação gama _____	37
3.2.1. Material _____	37
3.2.1.1. Amostras _____	37
3.2.2. Métodos _____	37
3.2.3. Análise Sensorial: Teste de Aceitação _____	38
3.2.4. Análise microbiológica _____	40
3.2.4.1. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, Enterobactérias e bactérias lácticas. _____	40
3.3. Análise instrumental de cor, determinação de ácido ascórbico, dehidroascórbico, vitamina C total, quantificação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, em espinafre (<i>Tetragonia expansa</i>) irradiado e armazenado a (4±1) °C por 12 dias nas quatro estações do ano. _____	41
3.3.1. Preparo das amostras _____	41
3.3.2. Análise Instrumental de cor _____	41
3.3.3. Determinação do conteúdo de ácido ascórbico, dehidroascórbico e vitamina C total nas amostras de espinafre durante 12 dias de armazenamento a (4±1) °C em cada estação do ano (PASTERNAK et al., 2005) _____	42
3.3.4. Quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante em amostras de espinafre durante 12 dias de armazenamento a (4±1) °C em cada estação do ano _____	43

3.3.4.1	Quantificação de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD).	44
3.3.4.2.	Quantificação de compostos fenólicos e análise da capacidade antioxidante.	45
3.3.4.2.1.	Preparo do extrato metanólico.	45
3.3.4.2.2.	Quantificação de compostos fenólicos pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau (SWAIN; HILLIS, 1959).	45
3.3.4.2.3.	Capacidade antioxidante.	45
3.4.	Análise Estatística	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1.	Resistência de <i>Salmonella</i> spp, <i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga e <i>L. monocytogenes</i> em espinafre irradiado	47
4.2.	Avaliação do efeito da radiação gama no comportamento de <i>Salmonella</i> spp, STEC e <i>L. monocytogenes</i> inoculadas em espinafre, armazenados a (4±1) °C e a (10±1) °C por 12 dias.	50
4.3.	Estudo da vida de prateleira de espinafre minimamente processado exposto à radiação gama.	55
4.3.1.	Análise sensorial	55
4.3.2.	Análise microbiológica	58
4.4.	Cor instrumental de espinafre minimamente processado exposto à radiação e armazenado a (4±1) °C por 12 dias nas quatro estações do ano	60
4.5.	Determinação do conteúdo de ácido ascórbico, dehidroascórbico e vitamina C total nas amostras de espinafre durante 12 dias de armazenamento a (4±1) °C	68
4.6.	Quantificação de flavonoides, fenólicos totais e capacidade antioxidante em espinafre minimamente processado irradiado e armazenado a (4±1) °C por 12 dias	69
5.	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

A preocupação por uma alimentação saudável associada à busca por conveniência no preparo das refeições aumentou o consumo de hortaliças frescas, o que desencadeou a produção de inúmeros produtos oferecidos para consumo imediato, entre eles, os denominados minimamente processados (MP).

O processamento mínimo pode ser descrito como a manipulação, o preparo, a embalagem e a distribuição de produtos agrícolas que, embora modificados fisicamente, mantêm as mesmas características do produto *in natura*, como frescor, sabor e nutrientes, inalterando suas características sensoriais (ROLLE; CHISM, 1987).

No Brasil, o processamento mínimo de frutas e hortaliças foi introduzido em meados da década de 90, com a chegada das redes de "fast food" (MORETTI; MACHADO, 2006).

Segundo levantamento feito pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA) do Estado de São Paulo, a produção média das principais hortaliças no Brasil, em 2011, foi de 19,6 milhões de toneladas, com uma área cultivada ultrapassando os 900 mil hectares. Entre elas, o espinafre ocupa lugar de destaque, com uma produção de 10.160 toneladas no período de 2010-2011, no Estado de São Paulo (CAMARGO FILHO; OLIVEIRA, 2012).

O espinafre é um vegetal comumente consumido pela população brasileira, porém o verdadeiro espinafre (*Spinacea oleracea*) com folhas pequenas e redondas não se desenvolve bem em climas quentes e por esta razão não é amplamente comercializado no Brasil. Em seu lugar, é utilizado o espinafre *Tetragonia expansa*, originário da Nova Zelândia, com folhas triangulares, verde-escuras (KAWASHIMA; VALENTE SOARES, 2005). É um alimento com baixo valor calórico, pois 100g de espinafre contém 22 calorias, sendo uma boa fonte de minerais, entre eles o ferro, vitaminas, especialmente vitamina C, E e do precursor da vitamina A, o β -caroteno. Suas folhas verde-escuras contêm outros nutrientes valiosos, especialmente compostos antioxidantes e bioflavonoides que ajudam a bloquear a ação de substâncias causadoras de câncer (FRANCO, 2004; SULTANA; ANWAR, 2008). A vida de prateleira do espinafre *in natura* é de aproximadamente cinco dias sob refrigeração, aumentando para 12 dias quando minimamente processado (NEAL et

al., 2010). Por esse motivo, a oferta dessa hortaliça minimamente processada tem aumentado.

Apesar das inúmeras vantagens dos vegetais minimamente processados (VMP), o risco potencial para a saúde pública aumentou, pois muitas operações como corte, lavagem e embalagem, podem aumentar a probabilidade de contaminação microbiana.

Dados apresentados pelo Centers for Disease Control – CDC dos Estados Unidos (CDC, 2005) indicam uma frequência crescente do envolvimento de alimentos de origem vegetal, principalmente, frutas e hortaliças nos casos e surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA). Alguns vegetais como alface, espinafre, brotos de vegetais, têm sido associados a surtos envolvendo o patógeno entérico, *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (CDC 2006; STRUELENS; PALM; TAKKINEN, 2011).

Além de STEC ser um dos principais patógenos responsáveis por surtos nesse tipo de alimento, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* também merecem destaque, sendo os principais responsáveis por infecções de origem alimentar, de modo geral. De acordo com o CDC (2013), entre os anos de 2009-2010 nos Estados Unidos (EUA), foram notificados 1527 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, resultando em 29444 casos de doenças, 1184 hospitalizações e 23 óbitos. *Salmonella* foi a responsável pela maioria dos casos com 583 (49%) hospitalizações, seguida por STEC com 190 (16%). Surtos causados por *Listeria* resultaram numa maior proporção de pessoas hospitalizadas (82%). Dentre os 23 óbitos, 22 foram atribuídos a bactérias (nove a *L. monocytogenes*, cinco a *Salmonella*, quatro a STEC O157, três a *Clostridium perfringens* e um a *Shigella*). *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais comum encontrado entre os 225 surtos confirmados com 34%, enquanto o sorogrupo O157 de STEC foi responsável por 53 dos surtos confirmados.

A prevenção de enfermidades por ingestão de produtos vegetais contaminados por micro-organismos patogênicos pode ser realizada com a aplicação de Boas Práticas Agrícolas (BPA) e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) durante toda a cadeia produtiva desses produtos e implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – HACCP (BEUCHAT, 2002).

A higienização (ou sanitização), do ponto de vista conceitual, divide-se em duas etapas: limpeza e sanificação. Na limpeza, objetiva-se a remoção de resíduos

orgânicos e minerais. Na sanificação, procura-se eliminar ou reduzir o número de micro-organismos patogênicos e o de saprófitas. Processos físicos e químicos podem ser empregados na sanificação, como tratamento térmico, radiação ultravioleta, radiação gama, ozônio, compostos clorados e iodados, ácido peracético, compostos quaternários de amônio, etc.

Apesar de não haver relatos sobre surtos ocasionados pela ingestão de vegetais no Brasil, a presença de *Salmonella* e *L. monocytogenes* em vegetais minimamente processados já foi detectada como relata o trabalho de Fröder et al. (2007). Assim, verifica-se que o processamento mínimo não é suficiente para eliminar os perigos microbiológicos colocando em risco a saúde da população.

1.1. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga – características e importância.

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae. São bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria também fermenta a lactose produzindo ácido e gás (HOLT et al., 1994). Compreendem grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados com as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, antígenos O, K e H, que, por convenção internacional, são designados por números arábicos colocados após cada letra, como por exemplo, O26:K60:H11. Entretanto, nem todas as linhagens de *E. coli* apresentam os três tipos de antígenos simultaneamente (MARTINEZ; TRABULSI, 2008). A maioria das cepas de *E. coli* não é patogênica. As cepas patogênicas são classificadas de acordo com seu mecanismo de patogenicidade em seis grupos: *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) ou de verotoxinas (VTEC), *E. coli* enteroinvasoras (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas – (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Entre os sorogrupos de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), o O157 recebeu grande atenção por parte dos microbiologistas por ser o mais associado a enfermidades transmitidas por alimentos.

As STEC são encontradas no intestino de diversas espécies de animais domésticos e silvestres de sangue quente, sendo os ruminantes os principais reservatórios. Essas bactérias podem causar diversas patologias no ser humano, como diarreia branda, sanguinolenta (colite hemorrágica - CH) e síndrome hemolítica urêmica (HUS) em crianças e adultos, sendo esta última a principal complicação das infecções causadas por STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Essas patologias decorrem da produção da toxina de Shiga (Stx), considerada o principal fator de virulência das STEC, que é dividida em dois grupos, Stx1 que é idêntica à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* 1, e Stx2 que apresenta menos de 60% de homologia com a sequência de aminoácidos de Stx1 (GUTH, 2008).

Além da toxina, alguns sorotipos de STEC produzem uma lesão chamada *attaching and effacing* (A/E), que é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e pela íntima fixação da bactéria à membrana epitelial do hospedeiro (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A infecção por esse micro-organismo ocorre, geralmente, após a ingestão de alimentos ou água contaminados, algumas vezes com número de células muito baixo, especialmente nos surtos causados pelo sorotipo O157:H7, em que menos de 100 células são capazes de causar a doença. O período de incubação é, em média, de três a quatro dias (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Os principais alimentos envolvidos na transmissão deste patógeno são carnes bovinas, especialmente as moídas (DONTOROU et al., 2003; CHINENI et al., 2009), leite não pasteurizado e derivados (DONTOROU et al., 2003) e vegetais contaminados (ACKERS et al., 1998; RANGEL et al., 2005).

Os brotos de vegetais têm sido frequentemente envolvidos em surtos por STEC, como ocorreu em Sakai, no Japão, em 1996, devido ao consumo de brotos de rabanete na merenda escolar contaminados com *E. coli* O157:H7, ocasionando 9451 casos da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 1996).

Entre os meses de junho e julho de 1997, surtos simultâneos de *E. coli* O157:H7 associados ao consumo de brotos de alfafa ocorreram nos EUA, nos Estados de Michigan e Virginia, sendo a origem da contaminação, sementes de um mesmo lote (CDC, 1997).

Espinafre contaminado com *E. coli* O157:H7, foi o responsável por um surto que ocorreu em setembro de 2006. Nesse surto, três pacientes foram a óbito, houve inúmeras hospitalizações e as perdas econômicas para a indústria de hortaliças verdes, foram estimadas em 150 milhões de dólares. Esse surto abrangeu 26 Estados ou províncias dos EUA e Canadá (UNITED STATES, 2007).

Em 2010, nos EUA, um lote de alface contaminado com STEC O145 deixou 26 pessoas doentes, sendo que dos 12 indivíduos hospitalizados, três desenvolveram falência renal decorrente de HUS (CDC, 2010).

Em abril de 2011, amêndoas contaminadas com *E. coli* O157:H7 foram responsáveis por um surto nos EUA (CDC, 2011a). Nesse mesmo ano, entre os meses de junho e julho de 2011, na Alemanha, STEC O104:H4, associado ao consumo de brotos foi responsável por surto que envolveu 852 pessoas, com 32 mortes (STRUELENS; PALM; TAKKINEN, 2011).

De acordo com o CDC, nos EUA, entre outubro e novembro de 2012, *E. coli* O157:H7 foi responsável por surto causado pela ingestão de espinafre orgânico e mistura de salada primavera (mix de folhas verdes). Um total de 33 pessoas foram infectadas em cinco Estados (Connecticut, Massachusetts, Nova Iorque, Pensilvânia e Virginia). Houve a hospitalização de 13 pessoas, e duas desenvolveram HUS (CDC, 2012a).

O surto mais recente de que se tem conhecimento, envolvendo *E. coli* O157:H7, foi notificado pela Public Health Agency of Canada (PHAC), Canadá, em janeiro de 2013, ligado ao consumo de alface picado distribuído pela empresa Fast Point Inc. para restaurantes fast food como KFC e Taco Bell. O vegetal era originário da Califórnia. Nesse surto, 26 pessoas desenvolveram a doença e dentre essas, 11 com idades entre 2 e 83 anos foram hospitalizadas. Esse surto ocorreu entre o mês de dezembro de 2012 e janeiro de 2013 (WHITWORTH, 2013).

1.2. *Salmonella* spp. – características e importância

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae. São bacilos Gram-negativos, não esporulados, geralmente móveis devido à presença de flagelos peritríquios. São anaeróbios facultativos, intracelulares facultativos, possuem a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, fermentam a glicose produzindo gás. São

oxidase negativa, catalase e lisina descarboxilase positiva, utilizam citrato como a única fonte de carbono (HOLT et al., 1994).

A temperatura ideal para a sua multiplicação é 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima 47°C (HOLT et al., 1994).

O gênero *Salmonella* é dividido em tipos sorológicos segundo o esquema de Kauffmann & White, tendo por base a composição antigênica das salmonelas com relação aos seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar) (HOLT et al., 1994).

O esquema de classificação mais recente propõe a divisão do gênero em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a primeira constituída por seis subespécies (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*). A maioria dos sorotipos responsáveis por causar enfermidades no homem e nos animais está contida na espécie *enterica*, subsp. *enterica* (POPOFF; LE MINOR, 2005).

As salmonelas são responsáveis por três grandes síndromes: febre tifóide, febres entéricas e as enterocolites.

A febre tifóide tem como agente etiológico *S. Typhi* e só acomete o ser humano, sendo este o único reservatório da bactéria. A doença normalmente é transmitida por água e alimentos contaminados com material fecal humano. Os principais sintomas são febre prolongada (10 a 14 dias), dor de cabeça, desconforto abdominal e letargia generalizada. A bactéria se multiplica no baço e no fígado, sendo em seguida liberada na corrente sanguínea, ocasionando sintomas inespecíficos, como calafrios, tontura, anorexia, tosse, fraqueza, dor de garganta e dores musculares. Pode ocorrer complicação, com a perfuração do intestino delgado. (D'AOUST; MAURER, 2007).

A febre entérica ou febre paratifóide tem como agentes etiológicos os sorotipos *Salmonella* Paratyphi A e C, que causam doença semelhante à febre tifóide, mas com sintomas mais brandos. Geralmente ocorrem septicemia, febre, vômitos e diarreia, com duração máxima de três semanas. Também só acomete os seres humanos, sendo igualmente transmitida pelo consumo de água e alimentos contaminados (D'AOUST; MAURER, 2007).

Salmoneloses ou enterocolites são causadas pelos demais sorotipos de *Salmonella*. Caracterizam-se por um quadro clínico que inclui febre, diarreia, dores

abdominais, náuseas, vômitos, calafrios e cefaléia. O período de incubação é, em média, de 48 horas. De um modo geral, as enterocolites por *Salmonella* são auto limitantes, não necessitando de tratamento com antibióticos, embora para determinados grupos de risco, tais como crianças, idosos e imunodeprimidos, a enfermidade possa vir a se agravar, já que o micro-organismo pode atingir a corrente sanguínea e provocar infecção e lesões em outros órgãos. As salmonelas atravessam a camada epitelial intestinal, penetram no lúmen intestinal, onde se proliferam provocando inflamações, causando enterocolite e perda de fluido intestinal (D'AOUST; MAURER, 2007).

Assim como para outros patógenos, a dose infectante capaz de produzir enfermidades por *Salmonella* varia com a idade, saúde do hospedeiro e virulência das cepas, não existindo uma dose específica. Alguns trabalhos relatam que a dose infectante pode ser de 15-20 células (UNITED STATES, 1998), no entanto, outros consideram que é preciso ter 10^6 UFC ou mais para a manifestação dos sintomas (D'AOUST; MAURER, 2007).

O habitat primário de *Salmonella* spp. é o trato gastrointestinal dos animais, como os pássaros, répteis, mamíferos domésticos e silvestres, humanos e ocasionalmente insetos. São excretadas nas fezes a partir das quais podem ser transmitidas para insetos e outros animais, podendo também ser encontradas na água, principalmente água poluída. Quando água ou alimentos contaminados são ingeridos pelo homem ou outros animais, esses organismos são novamente liberados através do material fecal dando continuidade ao ciclo (D'AOUST; MAURER, 2007).

Nos últimos 15 anos, nos EUA, as infecções por *Salmonella* aumentaram em 10%, de acordo com o relatório do CDC, enquanto que no mesmo período, as doenças provocadas por STEC, do sorogrupo O157 foram reduzidas quase pela metade (CDC, 2011b).

Surtos envolvendo *Salmonella* são bastante frequentes e têm sido associados ao consumo de diversos vegetais, como broto de feijão, tomates crus (BEUCHAT, 1996), salada de repolho (FRANCIS; THOMAS; O'BEIRNE, 1999), brotos de alfafa, melão, sucos de maçã e laranja não pasteurizados (BEUCHAT, 1998; PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE - PHLS, 2000), alface e salada de vegetais folhosos (SAGOO et al., 2003).

Durante o verão de 2004, três surtos envolvendo *Salmonella* foram associados ao consumo de tomates variedade Roma nos EUA e Canadá (CDC, 2005). Nesse mesmo ano, na Noruega, ocorreu um surto associado ao consumo de rúcula causado por *Salmonella* Thompson (NYGÅRD et al., 2004).

Em 2006, na Suécia, foi registrado surto por *S. Bareilly* e *S. Virchow* devido ao consumo de feijão verde (mung bean) importado da Ásia (DE JONG; ÖBERG; SVENUNGSSON, 2007).

Em 2011, diversos sorovares de *Salmonella* estiveram envolvidos em surtos de ETA ocorridos nos EUA por estarem contaminando vegetais como melão (CDC, 2011c), mamão papaia (CDC, 2011d) e pinhão (CDC, 2011f). Desses vegetais, o mamão papaia era importado do México e o pinhão da Turquia.

Entre os meses de julho e setembro de 2012, foi registrado surto por *Salmonella* Typhimurium e *S. Newport* em 24 Estados dos EUA, ligado ao consumo de melões originários de uma fazenda em Owensville, Indiana. Um total de 261 pessoas foi acometido (228 com *S. Typhimurium* e 33 com *S. Newport*), sendo que 94 pessoas foram hospitalizadas e três vieram a óbito (CDC, 2012b). Nesse mesmo ano, um surto por *S. Braenderup*, associado ao consumo de mangas contaminadas, provenientes do México, envolveu 127 pessoas em 15 Estados dos EUA, com 13 pessoas sendo hospitalizadas (CDC, 2012c).

1.3. *Listeria monocytogenes* – características e importância

As bactérias do gênero *Listeria* são bastonetes Gram-positivos, catalase-positivos, oxidase-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e são móveis com flagelos peritríquios quando incubados a 20-25°C (HOLT et al., 1994). Apresentam crescimento entre 2°C e 45°C, com temperatura ótima variando de 30°C a 37°C, sendo capazes de se desenvolver sob refrigeração podendo proliferar em alimentos mantidos nessas condições (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007).

A espécie *L. monocytogenes* é patogênica tanto para o homem quanto para os animais. Sob circunstâncias normais, qualquer pessoa pode ser infectada pelo patógeno, porém, muitas permanecem assintomáticas, indicando que alguns indivíduos possuem resistência imunológica a esse micro-organismo (BUCKRIESER

et al., 2003). Sua importância, porém, é justificada pela gravidade com que acomete populações consideradas de risco. Trata-se de um micro-organismo oportunista que afeta preferencialmente gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores de HIV, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do sistema imunológico (PAINTER; SLUTSKER, 2007). Porém, a doença pode, ocasionalmente, acometer indivíduos não predispostos (RYSER; DONNELLY, 2001). Idosos e recém-nascidos também são suscetíveis à listeriose e enquadrados como indivíduos de alto risco (PAINTER; SLUTSKER, 2007).

Os principais sintomas de listeriose são meningite, endocardite, bacteremia primária e septicemia (PAINTER; SLUTSKER, 2007). As gestantes podem não apresentar sintomas preocupantes, mas quando há manifestação da doença, pode ocorrer aborto, nascimento prematuro ou o feto vir a óbito (DOGANAY, 2003).

Outro tipo, mais brando, de listeriose é a doença gastrointestinal autolimitada e não invasiva, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, após 12 a 24 horas de exposição (PAINTER; SLUTSKER, 2007).

L. monocytogenes é frequentemente associada à vegetação e ao solo e parece ser mais comum em vegetais que crescem próximos ao solo. Diversos são os alimentos que já foram envolvidos em surtos de listeriose, entre eles, leite, queijos, carne bovina e derivados, aves, frutos do mar, alimentos de origem vegetal e refeições prontas. Os dois primeiros surtos associados a vegetais, causados por esse micro-organismo, ocorreram em 1979 e 1981 nos EUA e Canadá, respectivamente. O primeiro foi associado ao consumo de salada de vegetais com salsa, tomate e alface, e o segundo surto foi associado à salada de repolho e cenoura ("coleslaw"), sendo o repolho o vegetal contaminante (SCHLECH III et al., 1983).

Em 1997, *L. monocytogenes* foi implicada como agente causal de um surto no norte da Itália, associado ao consumo de salada de milho e atum, sendo o milho o alimento incriminado (AURELI et al., 2000).

Entre agosto e setembro de 2011, *L. monocytogenes* foi responsável por um surto ocorrido em 26 Estados nos EUA, associado ao consumo de melões, com notificação de 123 casos e 25 mortes (CDC, 2011e).

1.4. Irradiação de Alimentos

O termo radiação refere-se ao processo físico de emissão e propagação de energia enquanto o termo irradiação é utilizado para a aplicação desta energia a um determinado material, atingindo objetivos pré-estabelecidos (COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR – CNEN, 2011).

Há dois tipos de radiação, a não ionizante ou ultravioleta (UV) e a ionizante. A radiação UV é utilizada principalmente para a descontaminação do ar e ambiente, esterilização superficial da água e equipamentos. Na indústria de alimentos, é muito utilizada na esterilização de embalagens, esterilização superficial de pães e redução da microbiota superficial de carnes mantidas em câmaras de refrigeração (CNEN, 2011).

A radiação ionizante é caracterizada pelo seu elevado nível de energia, provocando ionização no meio em que é absorvida (MOLINS, 2001). Esse tipo de radiação é muito utilizado em processos de desinfestação, esterilização, inibição de processos fisiológicos e redução de contaminação microbiana, a fim de prolongar a vida útil dos alimentos (DIEHL, 1995).

A quantidade de radiação ionizante absorvida é chamada de dose de radiação absorvida e a unidade utilizada é o Gray (Gy), sendo que 1Gy é igual à energia de 1 Joule absorvido por 1kg de material. A variação de dose aplicada a um determinado tempo é obtida pela taxa de dose que é expressa em Gray por hora (Gy/h) (DIEHL, 1995).

A radiação gama é uma alternativa segura para a descontaminação de alimentos. A escolha da fonte para a radiação vai depender do material a ser irradiado e do objetivo a ser atingido. A radiação proveniente de ^{60}Co possui grande penetrabilidade e é utilizada na irradiação de materiais de grande espessura. A energia liberada pelos aceleradores de elétrons possui pequena penetração (apenas alguns milímetros) sendo usada para a irradiação superficial de alimentos ou para produtos a granel, de fina espessura. Irradiadores com fontes de ^{60}Co são os mais utilizados para o processamento de alimentos (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY – IAEA, 2001).

O uso da radiação gama como tecnologia de conservação de alimentos está basicamente ligado a três fatores: tipo de alimento a ser irradiado, dose a ser aplicada e tempo de exposição do alimento à fonte irradiadora, assim como a fatores

intrínsecos como tipo do tecido, porção da célula exposta ao processo, idade das células irradiadas, conteúdo de água presente nas células e a fatores bióticos, como temperatura, luminosidade e umidade relativa do ar (VIEITES, 1998) antes e, principalmente, durante e após o processo de irradiação.

Vários estudos indicam que a principal causa de letalidade dos micro-organismos induzida pelo processo de irradiação é a alteração sofrida pelo DNA microbiano, que perde a capacidade reprodutora, além de afetar outros componentes celulares importantes. A radiação interage com diversas substâncias, principalmente água (radiólise da água), formando radicais livres que são altamente reativos (DIEHL, 1995).

Os efeitos da radiação gama diferem dependendo do micro-organismo. Bactérias Gram-negativas são mais sensíveis à radiação, enquanto os esporos bacterianos e os fungos, assim como as bactérias Gram-positivas são mais resistentes (FARKAS, 1998). A resistência à irradiação das bactérias Gram-positivas, deve-se a maior quantidade de peptidoglicano na parede celular à produção de catalase e superóxido dismutase, que bloqueiam a ação de produtos radiolíticos tóxicos (URBAIN, 1986). A radiosensibilidade dos micro-organismos depende do seu estado fisiológico e sua fase de crescimento. As células vegetativas são mais sensíveis à radiação no final da fase logarítmica de crescimento. A resistência na fase lag pode ser devido ao conteúdo enzimático que reduz o nível de oxigênio intracelular (FARKAS, 1998). A radiosensibilidade também pode variar de acordo com o meio onde ocorre a irradiação, dependendo da atividade de água (A_w), pH, temperatura, presença ou ausência de oxigênio e composição química do meio (RADOMYSKY et al, 1994).

Desde que o processo de irradiação começou a ser usado na área de alimentos, pesquisas vem sendo desenvolvidas no sentido de estabelecer as doses de radiação que reduzem significativamente a carga microbiana sem que ocorra o comprometimento da qualidade sensorial e nutricional do produto, uma vez que o processo de irradiação, assim como qualquer outro processamento pode provocar alterações nos constituintes nutricionais dos alimentos. As principais alterações ocorrem em vitaminas e lipídeos, e em menor proporção em carboidratos e proteínas (FAN, 2012).

Ao avaliarem o efeito da irradiação gama em patógenos (*S. Typhimurium*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *L. ivanovii*) inoculados em vegetais prontos para o

consumo, Lee et al. (2006) observaram que a dose mínima necessária para manter a segurança microbiológica do produto foi de 3 kGy. Em um estudo feito sobre a retenção e os valores nutricionais de vegetais frescos como alface, espinafre, tomate, coentro, salsa, cebolinha, cenoura, brócolis, repolho roxo e aipo, tratados por baixa dose de radiação (1 kGy), Fan e Sokorai (2008) verificaram que não houve diferença na redução do conteúdo de vitamina C e nem na textura entre as amostras irradiadas e as não irradiadas.

Nunes et al. (2008) observaram o aumento no conteúdo de flavonoides na rúcula quando exposta a 1 kGy, e boa aceitabilidade sensorial do produto exposto a doses de até 2 kGy.

Em agosto de 2008, o governo dos EUA autorizou o uso da radiação no tratamento de espinafre e alface fresca, devido aos surtos de *E. coli* O157:H7 associados a esses produtos. De acordo com a Food and Drug Administration (UNITED STATES, 2008), a irradiação pode de fato reduzir a população de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, prolongando a vida de prateleira sem comprometer a segurança e a qualidade nutricional dos vegetais.

No Brasil, a legislação aprova o uso da radiação ionizante por meio da RDC nº 21, desde que seu uso seja para finalidade sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica. Além disso, a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a máxima deve ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais ou quaisquer atributos do alimento. Uma das principais observações, e que deve ser sempre ressaltada, é que o processo de irradiação, bem como qualquer outro tratamento aplicado nos alimentos não deve substituir as boas práticas de produção e manuseio (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2001).

1.5 Compostos Fenólicos

Substâncias naturalmente presentes em vegetais atuam em alvos fisiológicos específicos interferindo no processo patológico, reduzindo o risco de doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares (RAGAERT et al., 2004). Essas substâncias são chamadas de compostos bioativos. A ação protetora desses compostos é atribuída à sua ação antioxidante e consequentemente à capacidade

dessas substâncias de auxiliarem no combate aos radicais livres e ao estresse oxidativo (McCANN et al., 2007).

O efeito benéfico devido ao consumo de vegetais é atribuído em parte aos compostos que possuem atividade antioxidante. Os principais antioxidantes presentes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (PODSEDEK, 2007).

Os compostos fenólicos são caracterizados por uma estrutura aromática, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais, os quais podem ser substituídos por ésteres, ésteres metílicos e glicosídeos (MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005). Entre os compostos largamente distribuídos na natureza estão os flavonoides, ácidos fenólicos (benzoico, cinâmico e seus derivados) e as cumarinas. Possuem diferentes atividades biológicas como, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antitrombóticos, antialérgicos, e atividade antioxidante, atuando na prevenção de doenças cardiovasculares e do câncer (MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005).

Os flavonoides são compostos fenólicos apresentando 15 átomos de carbono, com dois anéis aromáticos unidos por três átomos de carbono, apresentando estrutura geral $C_6-C_3-C_6$. Podem ser encontrados em forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos). As principais subclasses dos flavonoides são as flavonas, flavanonas, flavonol, isoflavonas, flavonóis (catequinas) e antocianidinas (HO; RAFI; GHAI, 2010).

As flavonas, tais como a apigenina e luteolina, não apresentam oxigenação no C3, entretanto podem apresentar uma grande variedade de substituições, incluindo a hidroxilação, metilação, O- e C- alquilação e glicosilações. Muitas flavonas encontram-se como 7-O-glicosídeos. As flavonas são amplamente distribuídas na natureza, com significativa ocorrência em aipo, salsa e algumas ervas (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Os ácidos fenólicos são derivados fenilpropanóides apresentando como característica geral um anel aromático ligado a três carbonos. Recebem a designação geral de ácidos hidroxicinâmicos, entre eles o ácido caféico, ferúlico e p-cumárico são os mais encontrados na natureza. Podem ser encontrados em sua forma livre ou como ésteres e glicosídeos. Os ácidos clorogênicos são uma família de ésteres formados entre o ácido *trans* cinâmico e (-)-ácido quínico. Os ácidos clorogênicos são um subgrupo definido pelo número e identidade dos constituintes ácidos cinâmicos, podendo ser encontrados sob a forma de diversos isômeros.

Diversas plantas produzem o ácido clorogênico com esterificações nas posições 3, 4 e 5 da molécula do ácido quínico (PAPETTI et al., 2008).

De acordo com Dinelli et al. (2006), os flavonoides apresentam melhor capacidade antioxidante do que as vitaminas C e E. Esses compostos estão amplamente distribuídos entre os vegetais, porém sua concentração varia de planta para planta ou mesmo em diferentes órgãos de uma mesma planta. Sua formação nas plantas é influenciada por diversos fatores como luminosidade, fatores genéticos, condições ambientais, germinação, grau de maturação, técnicas de processamento e armazenamento, além da variedade dentro de uma mesma espécie.

Em condições de estresse como no processo de irradiação, pode ocorrer a indução da produção de flavonoides em alguns vegetais como mecanismo de proteção, através da ativação da atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase (PAL), que catalisa a desaminação da L-fenilalanina para formar o ácido trans-cinâmico, precursor dos flavonoides (metabólito secundário) (RYAN et al., 2002).

Como citado anteriormente, o processamento mínimo não é suficiente para eliminar os perigos microbiológicos colocando em risco a saúde da população, assim faz-se necessário a aplicação de outras tecnologias, como a radiação gama para melhorar a inocuidade desse tipo de alimento. Porém, como toda tecnologia, o processo de irradiação pode provocar alterações nos constituintes químicos e nutricionais dos alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da radiação gama em espinafre (*Tetragonia expansa*)

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade de *Salmonella* spp, *E. coli* produtora de toxina de Shiga e *L. monocytogenes* em espinafre exposto à radiação gama;
- Avaliar o efeito da radiação gama no comportamento de *Salmonella* spp, *E. coli* produtora de toxina de Shiga e *L. monocytogenes* em espinafre, armazenado a (4 ± 1) °C e a (10 ± 1) °C por 12 dias;
- Investigar os efeitos da radiação gama e das estações do ano sobre os atributos físico-químicos (cor, vitamina C, flavonoides, compostos fenólicos, atividade antioxidante) em espinafre armazenado a (4 ± 1) °C por 12 dias;
- Avaliar a vida de prateleira do espinafre irradiado através de análise sensorial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, de Análise Sensorial e de Bioquímica do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo.

Todos os meios de cultura utilizados foram da marca Oxoid (Basingstoke, Inglaterra), exceto quando destacado no texto. O preparo de todos os meios de cultura seguiu as instruções do fabricante.

3.1. Resistência de *Salmonella* spp, *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) e *L. monocytogenes* em espinafre irradiado

3.1.1. Material

3.1.1.1. Amostras

Nesta fase do projeto, amostras de espinafre (*Tetragonia expansa*) utilizadas, foram coletadas em supermercados na cidade de São Paulo, SP.

3.1.1.2 Cepas utilizadas

Foram utilizadas as seguintes cepas: três cepas de *Salmonella* (*S. Infantis*, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076), três cepas de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes* ATCC 19115, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* isolada de espinafre) e três cepas de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (*E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H7 EDL 933 e *E. coli* O157:H7 - 3104 88). Com exceção da cepa de *E. coli* EDL 933 cedida pela Dra. Roxane Maria F. Piazza do Instituto Butantan, São Paulo, SP, as demais pertencem à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF – USP, São Paulo, SP.

As cepas estavam armazenadas a -70°C em caldo tripticase de soja (TSB) adicionado de 20% de glicerol (Synth) para *Salmonella* e STEC e as de *L. monocytogenes* estavam mantidas em caldo TSB adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e 20% de glicerol.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Preparo das amostras de espinafre para inoculação

As folhas danificadas foram descartadas e as folhas e as hastes restantes lavadas em água fria e sanitizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 minutos. Em seguida, as folhas e as hastes foram centrifugadas para remover o excesso de água (NIEMIRA; SOMMERS; FAN, 2002).

3.1.2.2 Preparo do inóculo dos micro-organismos: *Salmonella* spp. *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) e *L. monocytogenes* (KANG; FUNG, 1999, com modificações)

3.1.2.2.1. *Salmonella* spp.

A partir de culturas individuais de *Salmonella* (item 3.1.1.2.) foram inoculados três tubos contendo caldo TSB e incubados a 37°C/24 horas para a reativação das cepas antes do início dos experimentos. Depois de serem reativadas, cada cepa foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de caldo TSB e incubados a 37°C. Após 24 horas, um inóculo de cada cultura foi transferido para um erlenmeyer contendo 100 mL de TSB e incubado a 37°C por 20-24 horas. Após esse período, 15 mL de cada cultura de *Salmonella* foram transferidos para um único tubo de centrifuga, totalizando assim, 45 mL de cultura de *Salmonella* spp sendo esta considerada o “pool” de *Salmonella*. Estes 45 mL foram centrifugados a 700 x g (Hettich, Tuttlingen, Germany) por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento re-

suspendido com 100 mL de solução salina (NaCl, 0,85%) (LabSynth). Aliquotas de 1 mL foram retiradas para posterior diluição e semeadas em TSA com sobrecamada de ágar MLCB para a determinação da população do micro-organismo. Obteve-se um inóculo com 10^8 a 10^9 UFC/mL. Todo processo de semeadura foi realizado em duplicata.

3.1.2.2.2. STEC

A partir das culturas individuais de STEC (item 3.1.1.2.) foram inoculados três tubos contendo caldo TSB e incubados a 37°C/24 horas para a reativação das cepas antes do início dos experimentos. Depois de serem reativadas, cada cepa foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de caldo TSB e incubados a 37°C. Após 24 horas, um inóculo de cada cultura foi transferido para um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo TSB e incubado a 37°C por 20-24 horas. Após esse período, 15 mL de cada cultura de STEC foram transferidos para um único tubo de centrifuga, totalizando, assim, 45 mL de cultura dessa bactéria, sendo este considerado o “pool” de STEC. Estes 45 mL foram centrifugados a 700 x g (Hettich, Tuttlingen, Germany) por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento re-suspendido em 100 mL de solução salina (0,85%). Aliquotas de 1 mL foram retiradas para posterior diluição e semeadas em TSA com sobrecamada de ágar MacConkey Sorbitol adicionado de telurito de potássio e antibiótico cefixime (SMAC-TC) para a determinação da população do micro-organismo. Obteve-se um inóculo com 10^8 a 10^9 UFC/mL. Todo processo de semeadura foi realizado em duplicata.

3.1.2.2.3. *L. monocytogenes*

A partir de culturas individuais de *L. monocytogenes* (item 3.1.1.2.) foram inoculados três tubos contendo caldo TSB-YE e incubados a 37°C/24 horas para a reativação das cepas antes do início dos experimentos. Depois de serem reativadas, cada cepa foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de caldo TSB-YE e incubados a 37°C. Após 24 horas, foi transferido um inóculo de cada cultura para um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo TSB-YE e incubado a 30°C por 20-24 horas. Após esse

período, 15 mL de cada cultura de *L. monocytogenes* foram transferidos para um único tubo de centrifuga, totalizando, assim, 45 mL de cultura sendo esta considerada o “pool” de *L. monocytogenes*. Estes 45 mL foram centrifugados a 700 x g (Hettich, 10 Tuttlingen, Germany) por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento re-suspendido com 100 mL de solução salina (0,85%). Alíquotas de 1 mL foram retiradas para posterior diluição e semeadas em TSA-YE com sobrecamada de ágar Oxford para a determinação da população do micro-organismo. Obteve-se um inóculo com 10^8 a 10^9 UFC/mL. Todo processo de semeadura foi realizado em duplicata.

3.1.3 Contaminação laboratorial de espinafre com *Salmonella* spp, STEC e *L. monocytogenes*

Os 100 mL da suspensão de cada bactéria (10^8 a 10^9 UFC/mL) obtida nos itens (3.1.2.2.1, 3.1.2.2.2. e 3.1.2.2.3) foram misturadas com 6 L de água fria (2 – 5°C) destilada estéril. Esta solução foi homogeneizada e retirou-se 1 mL para posterior diluição e semeadura em ágar TSA (*Salmonella* e STEC) ou ágar TSA-YE (*L. monocytogenes*) com sobrecamada de ágar MLCB e SMAC-TC para *Salmonella* e *E. coli*, respectivamente, e ágar Oxford para *L. monocytogenes*. Obteve-se uma concentração de 10^7 – 10^8 UFC/mL. Os espinafres foram imersos nessa suspensão por 15 min. Em seguida, foram centrifugados em um centrifugador tipo doméstico para saladas, previamente sanitizado, para remover o excesso de água da superfície (NIEMIRA; SOMMERS; FAN, 2002). Os vegetais foram divididos em porções de 40 g e colocados em sacos de polietileno (62 µm de espessura, permeabilidade ao O₂: 1375 m³ m⁻² por dia a 23°C, permeabilidade ao vapor de água: m⁻² dia⁻¹ a 38°C e umidade relativa de 90%) e selados em seladora (Modelo AP 500 – TecMaq®).

3.1.4. Processo de irradiação

As embalagens, em triplicata, contendo amostras de espinafres contaminados em laboratório, foram transportadas em caixa de material termoisolante com gelo para a planta de irradiação e expostas à radiação em um irradiador multipropósito,

pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, São Paulo, tendo como fonte radioativa ^{60}Co com uma atividade de 180 kCi. A taxa de dose média variou de 3,7 a 4,5 kGy/h. A calibração foi feita com dosímetro Gammachrome YR 530 nm.

As amostras foram submetidas às doses de 0,2 (0,20 – 0,24) kGy; 0,4 (0,40 – 0,48) kGy; 0,6 (0,60 – 0,64) kGy; 0,8 (0,80 – 0,83) kGy e 1,0 (0,99 – 1,09) kGy. Amostras-controle (não irradiadas) também foram utilizadas.

3.1.5 Enumeração de *Salmonella* spp., STEC e *L. monocytogenes* (KANG; FUNG, 1999, com modificações)

Amostras irradiadas e não-irradiadas (controle) foram mantidas sob refrigeração (4°C) por 24 horas até o início dos testes microbiológicos. Foram pesadas porções de 25 g de espinafre e homogeneizadas com 225 mL de solução de NaCl 0.85% (LabSynth) usando *stomacher* (Stomacher, 400, Seward, London, UK). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais em série com solução de NaCl 0.85% (LabSynth). Um mL de cada diluição foi semeado em meio TSA-YE para *L. monocytogenes* e em TSA para *Salmonella* e *E. coli* produtora de toxina de Shiga. Depois da solidificação, uma sobrecamada de ágar Oxford foi adicionada para determinar a população bacteriana sobrevivente de *L. monocytogenes* e de ágar MLCB para *Salmonella*. Para STEC foi utilizado o ágar SMAC-TC. Duas placas por diluição foram incubadas a 37°C por 24 horas.

3.1.6. Cálculo do valor D_{10}

O valor D_{10} foi calculado graficamente, através da análise de regressão linear utilizando o software Excel 12.0 (Microsoft® Excel, Office 2007, Redmond, WA, EUA).

3.1.7 Avaliação do efeito da radiação gama no comportamento de *Salmonella*, STEC e *L. monocytogenes* inoculadas em espinafre, armazenados a (4 ± 1) °C e a (10 ± 1) °C por 12 dias.

3.1.7.1. Preparo do inóculo

O preparo dos inóculos foi realizado conforme itens 3.1.2.2.1, 3.1.2.2.2. e 3.1.2.2.3.

3.1.7.2. Contaminação laboratorial dos vegetais para a avaliação do comportamento de *Salmonella* spp., STEC e *L. monocytogenes*.

Foi realizada conforme descrito no item 3.1.3.

3.1.7.3. Irradiação das amostras

Amostras de espinafre inoculadas com populações de aproximadamente 10^7 UFC/g de *Salmonella* spp., *E. coli* produtora de toxina de Shiga e *L. monocytogenes* foram embaladas (em triplicata) e transportadas ao IPEN e expostas à radiação em um irradiador multipropósito, tendo como fonte radioativa ^{60}Co com uma atividade de 180 kCi. A taxa de dose variou de 3,5 a 4 kGy/h. A calibração foi feita com dosímetro Gammachrome YR 530 nm (International Atomic Energy Agency - IAEA Technology, Harwell, Reino Unido).

As amostras de espinafre foram expostas a doses correspondentes a 5 vezes o valor D_{10} obtido para cada micro-organismo, de acordo com o recomendado pelo National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF, 1999): 1,0 (1,0 – 1,06) kGy; 1,05 (1,0 – 1,1) kGy e 0,85 (0,84 – 0,88) kGy para *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e STEC, respectivamente. Foram realizados três experimentos independentes para cada micro-organismo.

Amostras irradiadas e amostras-controle foram armazenadas a (4 ± 1) °C e a (10 ± 1) °C por 12 dias. As populações de *Salmonella* spp., STEC e *L. monocytogenes* foram enumeradas nos dias 0, 3, 6, 9 e 12.

3.1.7.4. Enumeração da população sobrevivente de *Salmonella* spp., STEC e *L. monocytogenes* (KANG; FUNG, 1999, com modificações).

Foi realizada conforme descrito no item 3.1.5.

3.2. Estudo de Vida de Prateleira de espinafre minimamente processado submetido à radiação gama

3.2.1. Material

3.2.1.1. Amostras

As amostras de espinafre (*Tetragonia expansa*) utilizados nesta etapa foram adquiridas de um produtor na cidade de Itatiba-SP.

3.2.2. Métodos

Para o estudo de vida de prateleira foram realizadas a análise sensorial e as análises microbiológicas.

As amostras de espinafre foram coletadas e preparadas conforme descrito no item 3.1.2.1. O transporte para a planta de irradiação (IPEN) foi feito em caixa de material termo isolante com gelo. As amostras foram expostas às doses de 1,0 (1,0 – 1,08) kGy e 1,5 (1,5 – 1,59) kGy. A taxa de dose foi de 3,0 kGy/h.

Após o processo de irradiação, todas as amostras foram armazenadas a (4 ± 1) °C durante 12 dias. As análises sensoriais e microbiológicas foram realizadas

nos dias 0, 5, 9 e 12, com o dia zero considerado 24 horas após o processo de irradiação.

3.2.3. Análise Sensorial: Teste de Aceitação

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP) (Protocolo CEP/FCF/553, CAAE: 0009.0.018.000-10) (Anexo A).

Os espinafres foram analisados sensorialmente para a avaliação de aceitabilidade, que foi medida através de uma escala hedônica não estruturada de 9 pontos, variando de extremamente desgostei (nota 1) a extremamente gostei (nota 9) (KADER; LIPTON; MORRIS, 1973.) (Figura 1). A equipe de provadores foi composta por 30 membros não treinados entre funcionários e estudantes da Universidade de São Paulo (USP). Eles avaliaram a aparência, sabor, aroma e textura dos produtos. O espinafre foi mantido sob refrigeração (4 ± 1) °C e 10 g das amostras irradiadas e controle foram servidas em pratos brancos de plástico. As amostras foram codificadas com três dígitos e acompanhadas por garfo, sal, um copo de água e biscoito de água e sal para minimizar o sabor residual entre uma amostra e outra, além da ficha para avaliação sensorial do espinafre (Figura 2). Os testes sensoriais ocorreram em cabines individuais com a utilização de luz branca no Laboratório de Análises Sensoriais de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, SP.

QUESTIONÁRIO

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE ESPINAFRE	
Nome: _____ Data: ____/____/____	
<p>Você está recebendo uma amostra codificada de espinafre. Tempere-a ao seu gosto com sal, prove-a avaliando sua aparência, aroma, sabor e textura (sensação das folhas e dos talos ao mastigar o vegetal) e marque com um “X” na escala abaixo o lugar (inclusive entre os pontos) que melhor represente o quanto você gostou ou desgostou da amostra.</p>	
Amostra nº. _____	
Aparência	1 ____ . ____ . ____ . ____ 5 ____ . ____ . ____ . ____ 9
Aroma	1 ____ . ____ . ____ . ____ 5 ____ . ____ . ____ . ____ 9
Sabor	1 ____ . ____ . ____ . ____ 5 ____ . ____ . ____ . ____ 9
Textura	1 ____ . ____ . ____ . ____ 5 ____ . ____ . ____ . ____ 9
Comentários:	
<hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	

Figura 1 – Modelo de ficha utilizada no teste de aceitação de espinafre (*Tetragonia expansa*) minimamente processado e irradiado.

Figura 2 – Apresentação das amostras para o teste de aceitação.

3.2.4. Análise microbiológica

3.2.4.1. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, Enterobacteriaceae e bactérias lácticas.

Porções de 25 gramas de espinafre foram analisadas para as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, membros da família Enterobacteriaceae e bactérias lácticas sendo inicialmente homogeneizadas com 225 mL de solução salina (NaCl 0.85% -LabSynth) usando *stomacher* (Stomacher, 400, Seward, London, UK). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais em série com solução de NaCl 0.85% (LabSynth). Um mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri estéreis e em seguida foram adicionados 15 a 20 mL de ágar Padrão de Contagem (PCA) para contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro (VRBG) para Enterobacteriaceae e ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) para contagem de bactérias lácticas. Depois da

solidificação, duas placas por diluição foram incubadas a 37°C/48 horas (PCA) (MORTON, 2001), 37°C/24 horas (VRBG) (KORNACKI; JOHNSON, 2001) e para as bactérias lácticas a incubação foi realizada a 30°C por 24 a 96 horas em jarros de anaerobiose com gerador de anaerobiose (AnaeroGen) (FLEMING; McFEETERS; BREIDT, 2001).

3.3. Análise instrumental de cor, determinação de ácido ascórbico, dehidroascórbico, vitamina C total, quantificação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, em espinafre (*Tetragonia expansa*) irradiado e armazenado a (4±1) °C por 12 dias nas quatro estações do ano

3.3.1. Preparo das amostras

As amostras de espinafre expostas às doses de 1,0 (1,0 – 1,08) kGy e 1,5 (1,5 – 1,59) kGy assim como as controle foram armazenadas a (4±1) °C por 12 dias e avaliadas quanto a cor instrumental nos dias 0, 5, 9 e 12 . As análises foram realizadas durante as quatro estações do ano (verão, outono, inverno e primavera) durante o ano de 2012.

Para a realização das análises químicas, nos dias pré-determinados as amostras foram pulverizadas com nitrogênio líquido, trituradas e mantidas a -70°C para posterior extração de ácido ascórbico, dehidroascórbico e compostos fenólicos.

3.3.2. Análise Instrumental de cor

As análises foram realizadas em colorímetro Hunter Color Lab (Hunterlab 12 Color Quest – CQXE/SAV/UV, Virginia, USA). Foi utilizado o software Universal Software 4.10 para calibrar a iluminação D65 com o ângulo de 10°, previamente calibrado com padrões de referência de preto e branco em uma abertura de 25,4 mm. As folhas de espinafre foram inseridas dentro de uma cubeta de quartzo, sendo que a parte central foi colocada contra a abertura do equipamento. Os resultados foram expressos em valor L^* (luminosidade), que varia do preto total ($L =$

0) ao branco total ($L = 100$); valor a^* , que caracteriza a coloração na região do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$); e valor b^* , que indica coloração no intervalo do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$) (KONIKA MINOLTA, 1994).

3.3.3. Determinação do conteúdo de ácido ascórbico, dehidroascórbico e vitamina C total nas amostras de espinafre durante 12 dias de armazenamento a $(4\pm 1)^\circ\text{C}$ em cada estação do ano (PASTERNAK et al., 2005)

No momento das análises, as amostras foram retiradas do freezer e a 0,5 g foram adicionados 3 mL de solução de ácido metafosfórico a 3% (Sigma, EUA). Essa solução foi homogeneizada em homogeneizador Potter (Glas-Col, EUA) por 1 minuto e depois centrifugada (Sorvall, EUA) por 30 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C . O precipitado foi desprezado e o volume do sobrenadante anotado para posterior cálculo. Este sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore®, porosidade $0,45 \mu\text{m}$.

Para a determinação de ácido ascórbico reduzido, 250 μL de amostra filtrada foram adicionados a 250 μL de ácido metafosfórico 3% e 500 μL de solução de KCl 2 mM, pH 2,5 (Merck, Alemanha).

Para a determinação do ácido ascórbico total, adicionaram-se a 250 μL de amostra filtrada, 250 μL de solução de ditioneitol (DTT) (Sigma, EUA) 0,5 M. Após 30 minutos, adicionaram-se 500 μL de solução de KCl 2 mM, pH 2,5. Todas estas etapas foram realizadas em banho de gelo.

O cromatógrafo utilizado para a quantificação da vitamina C foi o do sistema Hewlett-Packard 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detetor de diodos (DAD). A coluna utilizada foi a μ Bondapak C18 300 x 3,6 mm e porosidade $0,5 \mu\text{m}$ (Waters, EUA), e a eluição foi realizada por KCl 2 mM pH 2,5 (ajustado com ácido o-fosfórico).

Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra em base úmida (b.u.), através da análise das médias e desvios-padrão dos valores obtidos para as triplicatas de extração e duplicatas de injeção de cada uma das amostras.

O conteúdo de ácido dehidroascórbico foi obtido pela diferença entre o conteúdo de ácido ascórbico total e de ácido ascórbico reduzido.

3.3.4. Quantificação de compostos fenólicos totais, flavonóides e capacidade antioxidante em amostras de espinafre durante 12 dias de armazenamento a (4±1) °C em cada estação do ano

A extração de flavonoides e demais compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método descrito por Hassimotto, Genovese e Lajolo (2007). Foram pesadas 5g de amostra e a extração foi realizada com 100 mL de metanol 70% em homogeneizador Turrax (Brinkmann Homogenizer, Suíça). Posteriormente, a amostra foi filtrada a vácuo e o resíduo submetido à nova extração com 50 mL de metanol 70%. O extrato foi, então, concentrado em rotaevaporador (Rotaevaporador, R-3 HB, Büchi, Suíça). As amostras concentradas foram posteriormente ressuspensas em 100 mL de água deionizada e uma alíquota de 10 mL foi eluída em coluna de 1 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), sem vácuo, preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 50 mL de água deionizada. Após a passagem do extrato aquoso, lavou-se a coluna com 20 mL de água deionizada. A eluição dos flavonoides foi realizada com 50 mL de metanol e na sequência com 50 mL de metanol: hidróxido de amônia (95,5:0,5, v:v). O fluxo, através da coluna, foi controlado por meio do controle de vácuo do manifold (Visiprep 24 DL Supelco, Bellefonte, PA). Os eluatos foram completamente secos através de rotaevaporação sob vácuo a 40°C. Em seguida, foram ressuspensos em 1 mL de metanol e filtrados, em filtros de polietileno com membrana de politetrafluoretileno (PTFE, Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 µm de poro para a quantificação de flavonoides e ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo.

3.3.4.1. Quantificação de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD)

A quantificação e identificação de ácidos fenólicos e flavonóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE/DAD) (sistema Agilent 1260, com injetor automático e bomba quaternária, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). A coluna utilizada foi a Prodigy 5 μ ODS₃ (250 x 4,60 mm, Phenomenex Ltd., Reino Unido), com fluxo de 1 mL/min, temperatura de 30°C, e eluição com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5% e B: acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,5%. O gradiente utilizado é apresentado na Tabela 1. Foram utilizados os padrões apigenina (Extrasynthese, Genay, France) e ácido clorogênico (Sigma-Aldrich). Os ácidos fenólicos e flavonóides foram identificados através da similaridade do espectro de absorção. O flavonoide apigenina foi expresso como aglicona e os picos correspondentes ao ácido clorogênico foram expressos como derivado do ácido hidroxicinâmico equivalente em ácido clorogênico.

Tabela 1 – Gradiente de solventes para eluição dos compostos fenólicos.

Tempo	% de ácido fórmico	% de acetonitrila
0	90	10
5	90	10
15	80	20
25	75	25
33	65	35
38	50	50
43	10	90
44	10	90
45	10	90

3.3.4.2. Quantificação de compostos fenólicos e análise da capacidade antioxidante

3.3.4.2.1. Preparo do extrato metanólico

Para a obtenção do extrato metanólico, aproximadamente 0,6 g de amostra foram trituradas em 25 mL de metanol 70%, com o auxílio do homogeneizador Turrax (Brinkmann Homogenizer, Suíça) durante um minuto. Em seguida, essa amostra foi mantida sob agitação de 300 rpm, a 4°C por 30 minutos em agitador magnético (VARIOMAG – Eletroncruhrer, Multipoint HP6). O extrato foi filtrado em papel filtro (Nalgon, porosidade 3 µ, Brasil) e mantido no freezer (-20°C), por no máximo cinco dias, para a realização das análises de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

3.3.4.2.2. Quantificação de compostos fenólicos pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959)

A 250 µL do extrato obtido no item 3.5.2, foram adicionados 2 mL de água, 250 µL de reagente de Folin e 250 µL de solução saturada de carbonato de sódio. Essa mistura foi mantida em banho-maria a 37°C/30 min. As absorbâncias foram lidas a 765 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Boithec, Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Cambridge, England). Foi utilizado ácido gálico como padrão para a realização da curva de calibração. Os compostos fenólicos totais foram expressos em ácido gálico equivalente por 100g (GAE eq/100g).

3.3.4.2.3. Capacidade antioxidante

A análise de capacidade antioxidante foi realizada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Foram adicionados 40 µL de amostra em cavidades de microplaca com 96 cavidades de fundo em U 40. A seguir, foram adicionados 200 µL de solução DPPH (0,4925 mg DPPH/ 25 mL MeOH). As microplacas foram mantidas à temperatura

ambiente em ausência de luz por 20 minutos e posteriormente lidas em leitor de microplaca (Benchmark Plus, Microplate Spectrophotometer, Japan) em comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos em Trolox equivalente.

3.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA, seguida de teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5% de significância. O software estatístico utilizado nas análises foi o XLSTAT (Addinsoft, versão 2012, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resistência de *Salmonella* spp, *E. coli* produtora de toxina de Shiga e *L. monocytogenes* em espinafre irradiado

As Figuras 3, 4 e 5 mostram, respectivamente, as curvas de inativação de *Salmonella*, *L. monocytogenes* e STEC inoculadas em amostras de espinafre minimamente processado e expostas às doses de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 kGy. Os valores de D_{10} determinados neste estudo variaram de 0,19 a 0,20 kGy para *Salmonella* spp, de 0,20 a 0,21 kGy para *L. monocytogenes* e para STEC esse valor foi de 0,17 kGy, inferior aos encontrados para os demais micro-organismos.

A radio-sensibilidade de um micro-organismo é determinada pelo valor D_{10} , que pode apresentar variações para um mesmo micro-organismo devido à diferente composição química dos alimentos, estado físico e atmosfera em que o alimento se encontra, como pode ser observado pelos resultados obtidos para *Salmonella* por Dhokane et al (2006) em cenoura (0,31 kGy) e em pepino (0,35 kGy), por Martins et al (2004) em agrião (0,33 a 0,42 kGy) e por Lee et al (2006) em espinafre (0,37 kGy) e pepino (0,40 kGy).

Ao trabalhar com broto de rabanete, alfafa e brócolis, Rajkowski e Thayer (2000) encontraram valores de D_{10} ainda maiores para *Salmonella*, que variaram de 0,46 a 0,54 kGy.

Por outro lado, os resultados de D_{10} obtidos na presente pesquisa são semelhantes aos relatados por Nunes et al (2008) em rúcula irradiada (0,16 – 0,19 kGy) e por Goularte et al (2004) em alface irradiada (0,16 – 0,23 kGy).

A radio-sensibilidade do micro-organismo depende, também da variedade do vegetal, fato este comprovado por Niemira (2003) que verificou que os cultivares de alface lisa, americana, vermelha e Boston apresentaram valores de D_{10} de 0,31; 0,25; 0,23 e 0,24 kGy, respectivamente.

Figura 3 – Sobrevivência de *Salmonella* spp. inoculada em espinafre (*Tetragonia expansa*) e exposta a diferentes doses de radiação.

Para *L. monocytogenes*, os valores de D_{10} (Figura 4) são semelhantes aos relatados por Bari et al (2005) em endívia, repolho e tomate, Niemira (2003) em alface, Niemira et al (2003) em endívia e Tsuhako (2005) em alface, que obtiveram resultados que variaram de 0,19 a 0,25 kGy nos vegetais analisados.

Por outro lado, valores maiores do que os aqui apresentados para *L. monocytogenes* foram relatados por Lee et al (2006) para *L. ivanovii* inoculada em espinafre (0,41 kGy) e pepino (0,34 kGy) e por Nunes et al (2008) para *L. monocytogenes* inoculada em rúcula (0,37 a 0,48 kGy).

Figura 4 – Sobrevivência de *L. monocytogenes* inoculada em espinafre (*Tetragonia expansa*) e exposta a diferentes doses de radiação.

A Figura 5 apresenta as curvas de sobrevivência e os respectivos valores de D_{10} para STEC. Constata-se que os valores obtidos são semelhantes aos relatados por Hsu et al (2010) em menta irradiada (0,17 kGy).

Niemira, Sommers e Fan (2002), por outro lado, obtiveram valores menores do que os encontrados na presente pesquisa, entre 0,12 e 0,14 kGy, ao trabalharem com diversas variedades de alface (americana, vermelha, lisa e Boston).

A radiação ionizante também tem se mostrado eficaz na redução de *E. coli* O157:H7 internalizada em folhas de alface e espinafre (Niemira 2007, 2008) ao contrário do que ocorre com os tratamentos antimicrobianos que agem apenas na superfície do vegetal. Os valores de D_{10} obtidos por Niemira (2007, 2008) para *E. coli* O157:H7 variaram de 0,30 a 0,45 kGy em diversas variedades de alface, sendo que para folhas de espinafre esse valor foi de 0,27 kGy.

Figura 5 – Sobrevivência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga inoculada em espinafre (*Tetragonia expansa*) e exposta a diferentes doses de radiação.

O espinafre (*Spinacia oleracea*) utilizado por Lee et al (2006) e por Niemira (2007, 2008) pertence a um gênero diferente do utilizado no nosso trabalho (*Tetragonia expansa*), o que pode explicar a diferença na radio-sensibilidade dos micro-organismos estudados.

Por se tratar de uma bactéria Gram-positiva era esperado que *L. monocytogenes* apresentasse maior resistência à radiação do que as Gram-negativas, porém os valores de D_{10} foram similares para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.

4.2. Avaliação do efeito da radiação gama no comportamento de *Salmonella* spp., STEC e *L. monocytogenes* inoculadas em espinafre, armazenados a $(4\pm1)^\circ\text{C}$ e a $(10\pm1)^\circ\text{C}$ por 12 dias.

A temperatura é um fator importante na conservação da qualidade de frutas e hortaliças, pois além de influenciar na atividade respiratória dos vegetais age sobre a velocidade de multiplicação microbiana e na determinação da microbiota deteriorante (DELAQUIS, 2005). Em geral, a velocidade de multiplicação de grande

parte dos micro-organismos é reduzida em baixas temperaturas. Porém, essas condições favorecem a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos.

O abuso de temperatura (temperaturas mais elevadas do que a sugerida como adequada 4°C) durante a conservação dos alimentos pode ser observada em gôndolas de supermercados. Isso estimula a multiplicação de micro-organismos presentes no alimento, acelerando o processo de deterioração. Portanto, o uso combinação de baixas doses de radiação e de condições ideais de armazenamento (temperatura e umidade relativa) é eficaz no controle da deterioração dos alimentos (LACROIX; OUATTARA, 2000).

O National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF, 1999) recomenda que ocorra uma redução de, pelo menos, 5 ciclos logarítmicos na população de patógenos presentes em vegetais, independente da tecnologia utilizada, para que o alimento seja considerado microbiologicamente seguro.

Adotando esse critério, as doses a serem utilizadas para obter essa redução de 5 ciclos log seriam 0,85; 1,0 e 1,05 kGy, para STEC, *Salmonella* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

As amostras expostas a 1,0 kGy apresentaram redução de aproximadamente 6 ciclos logarítmicos na população de *Salmonella* spp. A população sobrevivente não apresentou capacidade de recuperação quando armazenada a (4±1) °C mesmo após 12 dias de armazenamento. Porém, nas amostras armazenadas a (10±1) °C houve um discreto aumento da população de 0,14 ciclos log (Tabela 2).

Tabela 2 – Comportamento de *Salmonella* spp (log UFC/g) inoculada em espinafre (*Tetragonia expansa*) minimamente processado e exposto à radiação, durante o armazenamento a (4±1) °C e a (10±1) °C até 12 dias.

Período de armazenamento (dias)	Temperatura / Dose (kGy)			
	4°C		10°C	
	Controle	1	Controle	1
0	6,27 ± 0,39 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	6,34 ± 0,46 ^{Aa}	<10 ^{Ab}
3	6,23 ± 0,42 ^{Aa}	0,11 ± 0,10 ^{Ab}	6,26 ± 0,50 ^{Aa}	0,34 ± 0,22 ^{Ab}
6	6,17 ± 0,46 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	6,28 ± 0,53 ^{Aa}	0,18 ± 0,16 ^{Ab}
9	6,10 ± 0,51 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	6,28 ± 0,52 ^{Aa}	0,02 ± 0,02 ^{Ab}
12	5,98 ± 0,62 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	6,31 ± 0,43 ^{Aa}	0,14 ± 0,25 ^{Ab}

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma temperatura, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as populações de *Salmonella* nos diferentes dias de armazenamento tanto para as amostras-controle como para as irradiadas (Tabela 2). A população de *Salmonella* manteve-se constante nas amostras não irradiadas durante todo o período de armazenamento, nas duas temperaturas de armazenamento.

O processo de irradiação também reduziu significativamente a população de STEC inoculada em espinafre ao longo de todo o período de armazenamento (12 dias) (Tabela 3).

A dose de 0,85 kGy reduziu a população de STEC em aproximadamente 6 ciclos logarítmicos, permanecendo em níveis não detectáveis tanto nas amostras armazenadas a (4 ± 1) °C como nas armazenadas a (10 ± 1) °C ao final do 12º dia de armazenamento.

Tabela 3 – Comportamento de STEC (log UFC/g) inoculada em espinafre (*Tetragonia expansa*) minimamente processado e exposto à radiação, durante o armazenamento a (4 ± 1) °C e a (10 ± 1) °C até 12 dias.

Período de armazenamento (dias)	Temperatura / Dose (kGy)			
	4°C		10°C	
	Controle	0,85	Controle	0,85
0	5,82 ± 0,09 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	5,94 ± 0,05 ^{Aa}	<10 ^{Ab}
3	5,66 ± 0,28 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	5,84 ± 0,12 ^{Aa}	0,27 ± 0,27 ^{Ab}
6	5,57 ± 0,08 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	5,93 ± 0,2 ^{Aa}	<10 ^{Ab}
9	5,55 ± 0,09 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	6,14 ± 0,22 ^{ABa}	<10 ^{Ab}
12	5,54 ± 0,05 ^{Aa}	<10 ^{Ab}	6,52 ± 0,12 ^{Ba}	<10 ^{Ab}

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma temperatura, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como para *Salmonella*, não houve diferença estatisticamente significativa na população de *E. coli* durante o período de armazenamento nas amostras irradiadas nas duas temperaturas de armazenamento e nas amostras não irradiadas e armazenadas a (4 ± 1) °C. No entanto, as amostras não irradiadas e armazenadas a (10 ± 1) °C apresentaram um crescimento de 0,58 ciclos logarítmicos ao final do período de armazenamento, que foi estatisticamente significativo

($p < 0,05$). Entretanto, microbiologicamente esse aumento na população tem pouco significado.

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatados por HSU et al (2010), ao verificarem uma redução de 5 log na população de *Salmonella* e de *E. coli* O157:H7 em menta irradiada com 1 kGy e armazenada a 4°C por 12 dias. As amostras não irradiadas apresentaram uma redução de 0,56 e 0,83 ciclos log ao final do 12º dia para *Salmonella* e STEC, respectivamente. Esse mesmo nível de redução foi obtido por Foley et al. (2004), ao trabalhar com coentro fresco contaminado com *E. coli* O157:H7 exposto a 1,05 kGy e armazenado a 4°C por 14 dias e por Shashidhar et al. (2007) em abacaxi, contaminado com *S. Typhimurium*, exposto a dose de 2 kGy e armazenado durante 12 dias a 4 e a 10°C.

A dose de 1,05 kGy causou a redução de aproximadamente 5 ciclos log na população de *L. monocytogenes* inoculada em espinafre (Tabela 4). Durante o armazenamento por 12 dias, constatou-se a recuperação estatisticamente significativa da população de *L. monocytogenes* em 0,22 ciclos log nas amostras armazenadas a (4±1) °C e de 2,62 ciclos log nas amostras armazenadas a (10±1) °C (Tabela 4).

Tabela 4 – Comportamento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) inoculada em espinafre (*Tetragonia expansa*) minimamente processado e exposto a radiação gama, durante o armazenamento a (4±1) °C e a (10±1) °C até 12 dias.

Período de armazenamento (dias)	Temperatura / Dose (kGy)			
	4°C		10°C	
	Controle	1,05	Controle	1,05
0	4,72 ± 0,10 ^{Aa}	0,10 ± 0,18 ^{Ab}	5,16 ± 0,24 ^{Aa}	<10 ^{Ab}
3	5,20 ± 0,05 ^{ABa}	0,10 ± 0,17 ^{Ab}	5,70 ± 0,08 ^{ABa}	0,43 ± 0,33 ^{Ab}
6	5,49 ± 0,12 ^{BCa}	0,01 ± 0,02 ^{Ab}	6,28 ± 0,19 ^{BCa}	2,11 ± 0,80 ^{Bb}
9	5,75 ± 0,03 ^{BCa}	0,80 ± 0,41 ^{Bb}	6,58 ± 0,13 ^{Ca}	2,57 ± 0,18 ^{Bb}
12	5,81 ± 0,08 ^{Ca}	0,32 ± 0,34 ^{ABb}	6,54 ± 0,05 ^{Ca}	2,62 ± 0,12 ^{Bb}

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma temperatura, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As amostras não irradiadas também apresentaram um aumento significativo na população de 1,09 e 1,38 ciclos log a (4±1) °C e a (10±1) °C, respectivamente.

O aumento na população observado nas amostras irradiadas pode ser decorrente de diversos fatores como a redução da microbiota competidora deteriorante e a capacidade de multiplicação deste micro-organismo sob baixas temperaturas. Diferentes espécies de micro-organismos, assim como diferentes cepas da mesma espécie não respondem da mesma forma perante a radiação. Muitos micro-organismos possuem a capacidade de reverter e até mesmo tolerar os danos provocados pela radiação ao material genético através do reparo do DNA lesado. Alguns constituintes nutricionais presentes nos alimentos, como os flavonoides, competem com as células microbianas pelo efeito radiolítico dos radicais livres, reduzindo assim os danos causados tornando o micro-organismo mais resistente (DIEHL, 1995).

Os resultados obtidos por Dhokane et al (2006) com cenoura e pepino exemplificam a influência do tipo de vegetal na radio-sensibilidade do micro-organismo. A dose de 1 kGy provocou a redução na população de *L. monocytogenes* de 2,19 log em cenoura e 3,89 log em pepino. Para *Salmonella* spp. essas reduções foram de 4,32 e 4,63 ciclos log, respectivamente.

Martins (2008) constatou que a dose de 1 kGy aplicada em agrião armazenado a 7°C por 16 dias foi suficiente para reduzir a população de *Salmonella* e de *L. monocytogenes* em 5 ciclos log, assim como Nunes (2008) em rúcula armazenada a 5°C por 16 dias.

Prakash et al. (2000) constataram redução semelhante a do presente trabalho na população de *L. monocytogenes* presente em aipo fatiado exposto a 1 kGy. O mesmo foi observado por Bari et al (2004) em repolho, tomate, broto de feijão e brócolis armazenados a 4°C por 10 dias.

A mudança na temperatura de armazenamento das amostras de espinafre, de (4 ± 1) °C para (10 ± 1) °C representou também um aumento significativo na população de *L. monocytogenes* nas amostras irradiadas e não irradiadas e de STEC nas amostras não irradiadas. Isso mostra que a variação na temperatura de refrigeração dos alimentos é um fator muito importante a ser considerado, pois o seu aumento causa, em consequência o aumento da velocidade de multiplicação do micro-organismo cuja população pode atingir níveis capazes de provocar problemas de saúde.

4.3. Estudo da vida de prateleira de espinafre minimamente processado exposto à radiação.

4.3.1. Análise Sensorial

Ao mesmo tempo em que a irradiação pode aumentar a segurança microbiológica de alimentos, também pode provocar alterações sensoriais indesejáveis, dependendo da dose utilizada. No caso do espinafre, de uma maneira geral, tanto a amostra-controle quanto as irradiadas com as doses de 1 e 1,5 kGy foram aceitas pelos provadores.

A Tabela 5 mostra as médias das notas atribuídas para aparência geral, aroma, sabor e textura das amostras de espinafre. Observa-se que não houve diferença significativa entre as amostras irradiadas e as controle para todos os atributos avaliados, apesar da queda verificada ao longo do período de armazenamento.

Com relação à aparência geral, as amostras irradiadas com 1,5 kGy apresentaram redução estatisticamente significativa na nota dada pelos provadores a partir do 9º dia de armazenamento, enquanto as demais não apresentaram essa diferença durante o período de armazenamento.

Tabela 5 – Médias das notas atribuídas à aparência, aroma, sabor e textura das amostras de espinafre (*Tetragonia expansa*).*

Atributos	Dose (kGy)	Tempo (dias)				Estimativa de vida de prateleira (dias)
		0	5	9	12	
Aparência	0	7,5 ^{A a}	7,5 ^{A a}	6,3 ^{A a}	6,4 ^{A a}	13
	1,0	7,3 ^{A a}	7,1 ^{A a}	6,0 ^{A a}	6,5 ^{A a}	15
	1,5	7,6 ^{A a}	7,3 ^{A ab}	6,3 ^{A bc}	6,0 ^{A c}	12
Aroma	0	6,6 ^{A a}	7,0 ^{A a}	6,0 ^{A a}	5,9 ^{A a}	13
	1,0	7,0 ^{A a}	7,2 ^{A a}	6,6 ^{A a}	6,4 ^{A a}	15
	1,5	6,8 ^{A a}	7,0 ^{A a}	6,2 ^{A a}	5,9 ^{A a}	12
Sabor	0	6,9 ^{A a}	7,0 ^{A a}	6,1 ^{A a}	6,3 ^{A a}	13
	1,0	7,0 ^{A a}	7,3 ^{A a}	6,5 ^{A a}	6,4 ^{A a}	15
	1,5	6,7 ^{A a}	7,1 ^{A a}	6,3 ^{A a}	6,0 ^{A a}	12
Textura	0	7,5 ^{A a}	6,9 ^{A a}	6,8 ^{A a}	6,8 ^{A a}	13
	1,0	7,2 ^{A a}	7,6 ^{A a}	6,5 ^{A a}	6,7 ^{A a}	15
	1,5	7,4 ^{A a}	7,6 ^{A a}	6,7 ^{A a}	6,4 ^{A a}	12

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para o mesmo atributo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os atributos aroma, sabor e textura não apresentaram diferenças significativas entre as amostras irradiadas e controle durante o período de armazenamento, o que mostra que o produto foi bem aceito pelos provadores.

Vários autores também não encontraram diferença significativa na aceitabilidade de outros vegetais como alface, agrião, salsa, coentro, menta e couve-flor irradiados com 0,5, 1,0, 1,5 e 2 kGy (BIB et al., 2005; TRIGO et al., 2009), brotos de feijão e rabanete irradiados com 2 kGy e 1,5 kGy, respectivamente (BARI et al., 2004), abacaxi e grão de bico com 2 kGy (HAJARE et al., 2006), e melancia minimamente processada irradiada com 1 e 2,5 kGy (MARTINS et al., 2008).

Ao trabalhar com kiwi exposto às doses de 1, 2 e 3 kGy, Kim e Yook (2009) não observaram diferença significativa entre as amostras, porém observaram que para os parâmetros sabor, doçura e aceitação global, as amostras irradiadas tiveram

maior preferência entre os provadores, e menor pontuação para acidez. Wani et al (2008) verificaram que peras irradiadas com 0,8 a 2 kGy apresentaram aceitação global baseada na cor, textura e sabor significativamente maior do que as amostras-controle, assim como Fan et al. (2003) que constataram que a aceitabilidade das amostras de alface americana irradiadas foi maior que a das amostras-controle durante os 21 dias de armazenamento.

Por outro lado, Fan, Niemira e Sokorai (2003b) verificaram que cebolinhas irradiadas com 2 e 3 kGy, apresentaram perda de aroma e deterioração visual da qualidade, enquanto a dose de 1 kGy melhorou a qualidade sensorial das amostras. Goularte et al (2004) observaram que alface americana irradiada com 0,7 e 0,9 kGy não apresentaram alterações nos atributos sensoriais, o que não ocorreu com aquelas irradiadas com 1,1 kGy que apresentaram alterações significativas na textura, sendo rejeitadas pelos provadores. O mesmo foi constatado por Zhang, Lu e Wang (2006) em alface cortada exposta a 0,5 e 1 kGy, porém a dose de 1,5 kGy apresentou redução na qualidade das amostras.

Os trabalhos acima mostram que doses de radiação de até 2 kGy não alteram, de modo geral, as características sensoriais da maioria dos vegetais, e que os folhosos são menos resistentes à radiação do que os demais, sendo que a dose ideal a ser aplicada nos vegetais folhosos deve ser de até 1 kGy.

Pela Tabela 5 também é possível observar que a vida de prateleira de espinafre irradiado com 1 kGy, mantido a (4 ± 1) °C, aumentou em dois dias em relação à amostra-controle, cuja vida de prateleira foi de 13 dias. Já as irradiadas com 1,5 kGy apresentaram perda de qualidade no 12º dia. Para agrião, a vida de prateleira foi de 16 dias quando irradiado com 1 kGy (MARTINS et al., 2004).

O final da vida de prateleira foi determinado por modificações na aparência e textura das folhas, como escurecimento e amolecimento, decorrentes de alterações químicas. O processamento mínimo conduz à aceleração do processo de degradação fisiológica e microbiológica (ALLENDE et al., 2006; RAGAERT; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2007). Os principais mecanismos de degradação são através da ação de enzimas liberadas durante o processamento (descascamento, corte, etc.), sendo as mais importantes a polifenol oxidase, que provoca o escurecimento, e a lipoxidase que catalisa reações de peroxidação, originando aldeídos e cetonas com aroma desagradável. Ocorre também um aumento na produção de etileno, que acelera o processo de amadurecimento, e um aumento na

taxa de respiração entre 20 e 70%, dependendo do produto e do tipo de processamento. As alterações devidas à atividade microbiana também aumentam, pois o processamento libera a seiva, criando condições para a multiplicação microbiana (SANTOS; OLIVEIRA, 2012).

4.3.2. Análise microbiológica

Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas durante o estudo de vida de prateleira de espinafre. Quando as amostras foram expostas a 1 kGy e 1,5 kGy, a população de Enterobacteriaceae foi reduzida a níveis não detectáveis pela metodologia empregada (<10 UFC/g.), enquanto as reduções de micro-organismos aeróbios mesófilos foram de 3,94 log UFC/g para as amostras expostas a 1 kGy e de 5,62 log UFC/g para as expostas a 1,5 kGy. Tanto para Enterobacteriaceae quanto para aeróbios mesófilos houve aumento estatisticamente significativo da população ao final do período de armazenamento das amostras não irradiadas e irradiadas. No caso da população de bactérias lácticas houve redução da população para níveis não detectáveis em todas as amostras irradiadas e, ao contrário do observado para Enterobacteriaceae e aeróbios mesófilos, a população das amostras não irradiadas apresentou redução estatisticamente significativa durante o armazenamento.

Na verdade, não se deve esperar que vegetais produzidos em um ambiente natural estejam livres de micro-organismos. No caso do espinafre cujas folhas encontram-se bem próximas ao solo, a contaminação pode ocorrer pelo contato com o solo ou através da água de irrigação e também pela adubação. Essas condições associadas à estrutura das folhas facilitam a sobrevivência e a multiplicação de micro-organismos patogênicos (GERMANO; GERMANO; de Oliveira; 2011).

Tabela 6 – Avaliação microbiológica das amostras de espinafre (*Tetragonia expansa*) minimamente processado e irradiado durante vida de prateleira

Grupos de Micro-organismos	Tempo*	Doses (kGy)			
		Controle	1	Redução (log UFC/g)	1,5
Enterobacteriaceae (log UFC/g)	0	2,77 ± 0,06 ^{Aa}	<1 ^{Ab}	2,77	<1. ^{Ab}
	5	3,14 ± 0,06 ^{Ba}	1,62 ± 0,28 ^{Bb}	1,52	<1. ^{Ac}
	9	3,86 ± 0,04 ^{Ca}	3,71 ± 0,06 ^{Ca}	0,15	<1. ^{Ab}
	12	4,75 ± 0,06 ^{Da}	4,13 ± 0,02 ^{Cb}	0,62	<1 ^{Ac}
Aeróbios mesófilos (log UFC/g)	0	5,62 ± 0,04 ^{Aa}	1,68 ± 0,20 ^{Ab}	3,94	<1. ^{Ac}
	5	5,44 ± 0,04 ^{Ba}	2,48 ± 0,03 ^{Bb}	2,96	<1. ^{Ac}
	9	5,69 ± 0,04 ^{Aa}	3,49 ± 0,02 ^{Cb}	2,20	2,42 ± 0,02 ^{Bc}
	12	5,65 ± 0,05 ^{Aa}	4,62 ± 0,04 ^{Db}	1,03	2,59 ± 0,15 ^{Bc}
Bactérias lácticas (log UFC/g)	0	4,07 ± 0,07 ^{Aa}	<1 ^{Ab}	4,07	<1 ^{Ab}
	5	2,83 ± 0,08 ^{Ba}	<1 ^{Ab}	2,83	<1 ^{Ab}
	9	2,50 ± 0,02 ^{Ca}	<1 ^{Ab}	2,50	<1. ^{Ab}
	12	2,44 ± 0,01 ^{Ca}	<1 ^{Ab}	2,44	<1 ^{Ab}

*Tempo de armazenamento em dias, a 4±1°C após irradiação.

<1 abaixo do limite de detecção.

^a Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para o mesmo tipo de micro-organismo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Zhang, Lu e Wang (2006) observaram reduções de 2,35 e 2,88 log UFC/g nas populações de aeróbios mesófilos em alface picada e irradiada com doses de 1 e 1,5 kGy, respectivamente, armazenadas a 4°C por 8 dias. Kim et al (2006), por outro lado, constataram reduções maiores que as relatadas por Zhang, Lu e Wang (2006) e as encontradas por nós. Expondo alface a 1 kGy, Kim et al. (2006) detectaram redução de 4,38 log UFC/g nas populações de aeróbios mesófilos e, de maneira semelhante aos resultados da presente pesquisa, a população de bactérias lácticas foi reduzida para níveis não detectáveis.

Ao avaliarem a qualidade microbiológica de alface irradiada com doses de 0,7; 0,9 e 1,1 kGy ao longo da vida de prateleira, Goularte et al (2004) verificaram reduções entre 2 e 3 log UFC/g nas populações de micro-organismos aeróbios mesófilos e entre 1 e 2 log UFC/g na população de Enterobacteriaceae. Martins et al (2007) observaram que doses de 1 kGy reduziram em 3 log UFC/g a população de aeróbios mesófilos em agrião MP. Para Enterobacteriaceae e bactérias lácticas, esses mesmos autores observaram uma redução de 1 a 3 log e de 1 a 4 log UFC/g, respectivamente, sendo inferior aos dados observados no presente trabalho. No

entanto, nesta pesquisa também foi observado um aumento na população desses micro-organismos após 12 dias de armazenamento. Em coentro irradiado com 1 kGy, Fan, Niemira e Sokorai (2003a) observaram, inicialmente, uma redução na população de micro-organismos aeróbios mesófilos e, após o 7º dia de armazenamento, um aumento de 1,4 log nas amostras irradiadas, semelhante ao ocorrido no presente trabalho. Ainda, como observado nesta pesquisa, esses autores constataram aumento da população microbiana nas amostras não irradiadas durante o período estudado.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o processo de irradiação apresentou uma redução estatisticamente significativa nas populações dos micro-organismos analisados. A dose de 1,5 kGy apresentou melhor resultado que a de 1 kGy, pois ela promoveu a redução de todos os micro-organismos analisados e manteve a contagem de bactérias lácticas e Enterobacteriaceae abaixo do limite de detecção do método empregado durante toda a vida de prateleira do espinafre.

4.4. Cor instrumental de espinafre minimamente processado exposto à radiação e armazenado a (4 ± 1) °C por 12 dias nas quatro estações do ano

A coloração de vegetais é um atributo muito importante na determinação da eficácia de tratamentos pós-colheita. Os consumidores podem ser facilmente influenciados por ideias pré-concebidas, principalmente sobre a aparência dos vegetais.

A refrigeração promove a redução na atividade de enzimas responsáveis pela degradação da clorofila, as chamadas clorofilases, mantendo a cor em alimentos refrigerados. De acordo com Rakotonirany, Wang e Padua (2001), o uso de temperaturas inferiores a 5°C é o fator mais importante para minimizar os efeitos das injúrias causadas pelo processamento mínimo de vegetais.

A cor é representada por três dimensões do sistema L^* , a^* e b^* , correspondente ao sistema XYZ CIE lab system (Figura 6). O valor de L^* representa a medida de luminosidade de uma amostra, sendo 100 para o branco total e zero para o preto total, assim como avaliado pelo olho humano. As tonalidades entre

vermelho e verde são determinadas pela letra ***a**** (-a: verde a +a: vermelho) e a variação entre as tonalidades azul e amarela, pela letra ***b**** (-b: azul a +b: amarelo) (KONIKA MINOLTA, 1994).

Figura 6 – Representação de coordenada do sistema L^* , a^* e b^* para avaliação de cor instrumental (KONIKA MINOLTA, 1994).

A coloração das folhas de espinafre está expressa em Luminosidade (Tabela 7), esverdeamento (Tabela 8) e amarelecimento (Tabela 9).

Não foram encontradas diferenças significativas de L^* entre os tratamentos nos dias 0 e 5 para nenhuma das quatro estações do ano (Tabela 7). A partir do 9º dia de armazenamento, é possível observar a redução no parâmetro luminosidade (L^*) das amostras, coletadas durante o verão, outono e inverno, expostas à radiação gama (Figura 7).

No 12º dia, as amostras-controle coletadas no verão e no inverno, apresentaram luminosidade significativamente superior à das amostras irradiadas com 1,5kGy. No outono, a luminosidade da amostra-controle foi significativamente superior à das amostras expostas a 1 e 1,5 kGy. Na primavera, houve diferença estatisticamente significativa entre a luminosidade das amostras.

Tabela 7 – Valores de Luminosidade (L*) para as folhas de espinafre (*Tetragonia expansa*) expostas a radiação e amostras-controle armazenadas a (4±1) °C por 12 dias*.

Estação	Dia	Tratamentos		
		Controle	1,0 kGy	1,5 kGy
Verão	0	35,1 ± 0,6 ^{Aa}	34,4 ± 0,8 ^{Aa}	34,3 ± 1,1 ^{Aa}
	5	35,4 ± 0,7 ^{Aa}	34,5 ± 1,2 ^{Aa}	34,3 ± 0,8 ^{Aa}
	9	35,3 ± 0,8 ^{Aa}	33,1 ± 1,8 ^{Ab}	33,0 ± 1,2 ^{Bb}
	12	35,4 ± 1,0 ^{Aa}	33,9 ± 1,5 ^{Ab}	33,2 ± 0,9 ^{ABb}
Outono	0	32,1 ± 0,8 ^{Aa}	32,4 ± 0,7 ^{Aa}	32,4 ± 0,5 ^{Aa}
	5	32,5 ± 0,6 ^{Aa}	32,1 ± 0,9 ^{ABa}	32,1 ± 0,6 ^{Aa}
	9	32,3 ± 0,6 ^{Aa}	30,3 ± 0,8 ^{BCb}	30,1 ± 1,1 ^{Bb}
	12	32,3 ± 0,8 ^{Aa}	30,1 ± 2,6 ^{Cb}	29,9 ± 1,7 ^{Bb}
Inverno	0	31,4 ± 1,5 ^{Aa}	30,4 ± 1,0 ^{ABa}	30,6 ± 0,6 ^{Aa}
	5	31,6 ± 1,5 ^{Aa}	30,8 ± 0,5 ^{Aa}	30,6 ± 1,0 ^{Aa}
	9	31,5 ± 0,9 ^{Aa}	28,6 ± 1,1 ^{Bb}	28,0 ± 1,6 ^{Bb}
	12	31,9 ± 1,3 ^{Aa}	30,3 ± 2,8 ^{ABab}	29,0 ± 2,5 ^{Bb}
Primavera	0	33,9 ± 1,1 ^{Aa}	34,4 ± 1,0 ^{Aa}	34,2 ± 1,0 ^{Aa}
	5	34,1 ± 1,5 ^{Aa}	33,6 ± 1,2 ^{ABa}	33,5 ± 1,4 ^{ABa}
	9	33,9 ± 1,2 ^{Aa}	33,0 ± 0,8 ^{Ba}	32,7 ± 0,8 ^{BCa}
	12	34,0 ± 0,5 ^{Aa}	33,1 ± 0,4 ^{Bb}	32,4 ± 0,6 ^{Cc}

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma estação não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

É possível observar a influência da estação do ano sobre a luminosidade das folhas de espinafre, uma vez que as amostras coletadas no verão apresentaram maior luminosidade, e para as coletadas no inverno esse parâmetro foi menor (Figura 7).

Figura 7 – Médias de L^* por dia entre os três tratamentos, durante as quatro estações do ano.

Com relação ao esverdeamento (a^*) (Tabela 8), não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos no dia 0 para as estações verão, outono e primavera. No inverno, o resultado de a^* foi significativamente inferior para as amostras expostas a 1,5 kGy, isto é, essas amostras apresentaram-se mais verdes do que as demais.

As amostras coletadas durante o verão e expostas à dose de 1,5 kGy apresentaram aumento no valor a^* a partir do 5º dia, enquanto aquelas irradiadas com 1 kGy apresentaram aumento desse valor a partir do 9º dia de armazenamento (Figura 8). O mesmo foi constatado para as amostras irradiadas, coletadas durante o inverno, onde o valor de a^* foi significativamente superior nas amostras irradiadas com 1,5 kGy.

No dia 9, o resultado da comparação foi o mesmo para o verão, outono e inverno. O resultado de a^* foi significativamente inferior para o controle em relação aos tratamentos com 1,0 kGy e 1,5 kGy. Na primavera, a diferença entre os tratamentos não foi significativa.

No dia 12, o controle foi significativamente inferior comparado ao tratamento com 1,5 kGy no verão, outono e na primavera. No outono, o tratamento com 1,0 kGy também foi significativamente inferior comparado ao 1,5kGy. No inverno, a diferença entre os tratamentos não foi significativa.

Tabela 8 – Valores de a^* para as folhas de espinafre (*Tetragonia expansa*) expostas a radiação e amostras-controle armazenadas a $(4\pm1)^\circ\text{C}$ por 12 dias*.

Estação	Dia	Tratamentos		
		Controle	1,0 kGy	1,5 kGy
Verão	0	$-5,2 \pm 0,4^{Aa}$	$-5,4 \pm 0,4^{Ac}$	$-5,0 \pm 0,6^{Ba}$
	5	$-5,4 \pm 0,7^{Aa}$	$-5,1 \pm 0,6^{ABab}$	$-4,2 \pm 0,7^{ABb}$
	9	$-5,2 \pm 1,0^{Aa}$	$-4,1 \pm 0,6^{Cb}$	$-4,1 \pm 0,8^{Bb}$
	12	$-5,2 \pm 0,7^{Aa}$	$-4,3 \pm 1,1^{BCab}$	$-4,0 \pm 0,5^{Bb}$
Outono	0	$-6,7 \pm 0,5^{Aa}$	$-6,7 \pm 0,3^{Aa}$	$-6,6 \pm 0,4^{Aa}$
	5	$-6,8 \pm 0,4^{Aa}$	$-6,5 \pm 0,4^{Aa}$	$-6,3 \pm 0,4^{Aa}$
	9	$-6,7 \pm 0,4^{Aa}$	$-5,2 \pm 0,6^{Bb}$	$-4,9 \pm 0,1^{Bb}$
	12	$-6,6 \pm 0,3^{Aa}$	$-5,8 \pm 0,7^{Bb}$	$-5,1 \pm 0,3^{Bb}$
Inverno	0	$-7,3 \pm 0,2^{Aa}$	$-7,4 \pm 0,4^{Aa}$	$-7,9 \pm 0,4^{Ab}$
	5	$-7,4 \pm 0,3^{Aa}$	$-7,3 \pm 0,3^{Aa}$	$-6,8 \pm 0,4^{Bb}$
	9	$-7,3 \pm 0,3^{Aa}$	$-5,9 \pm 0,8^{Bb}$	$-5,9 \pm 0,6^{Cb}$
	12	$-6,9 \pm 0,7^{Aa}$	$-6,2 \pm 0,6^{Ba}$	$-6,3 \pm 0,7^{BCa}$
Primavera	0	$-6,1 \pm 0,5^{Aa}$	$-6,3 \pm 0,3^{Aa}$	$-6,3 \pm 0,5^{Aa}$
	5	$-6,2 \pm 0,3^{Aa}$	$-6,1 \pm 0,4^{Aa}$	$-6,0 \pm 0,5^{Ba}$
	9	$-6,1 \pm 0,3^{Aa}$	$-5,9 \pm 0,6^{Aa}$	$-5,7 \pm 0,5^{Ba}$
	12	$-6,1 \pm 0,4^{Aa}$	$-5,8 \pm 0,7^{Aab}$	$-5,3 \pm 0,4^{Bb}$

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma estação não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Através da Figura 8, é possível observar diferenças entre as estações do ano com as amostras coletadas no verão tendo apresentado maior valor de a^* . O aumento no valor a^* indica perda da coloração verde.

Figura 8 – Médias de a^* por dia, entre os três tratamentos, durante as quatro estações do ano.

Os resultados apresentados na Tabela 9 são relacionados ao amarelecimento (b^*) das amostras, ou seja, quanto maior o valor de b^* mais próxima do amarelo estará a coloração. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nas amostras do dia zero para as estações verão, inverno e primavera. No outono, o resultado de b^* foi significativamente superior para o controle em comparação com as amostras expostas às doses de 1,0 kGy e 1,5 kGy.

No 5º dia de armazenamento, os valores de b^* foram estatisticamente maiores nas amostras controle do que nas amostras irradiadas em todas as estações do ano. No verão, houve diferença estatisticamente significativa entre as três amostras. O valor de b^* foi significativamente maior nas amostras controle do que nas irradiadas no 9º e no 12º dia de armazenamento, para todas as estações do ano (Figura 9).

É possível observar que o período de armazenamento não provocou alterações significativas nas amostras-controle.

Tabela 9 – Valores de b^* para as folhas de espinafre (*Tetragonia expansa*) expostas a radiação e amostras-controle armazenadas a $(4\pm 1)^\circ\text{C}$ por 12 dias*.

Estação	Dia	Tratamentos		
		Controle	1,0 kGy	1,5 kGy
Verão	0	$18,1 \pm 0,5^{Aa}$	$18,1 \pm 0,7^{Aa}$	$18,0 \pm 0,9^{Aa}$
	5	$18,1 \pm 0,5^{Aa}$	$17,4 \pm 0,6^{Aa}$	$16,4 \pm 0,5^{Bb}$
	9	$17,5 \pm 0,5^{Aa}$	$15,6 \pm 0,8^{Bb}$	$15,4 \pm 0,5^{Cb}$
	12	$17,4 \pm 0,7^{Aa}$	$15,5 \pm 0,5^{Bb}$	$15,1 \pm 0,7^{Cb}$
Outono	0	$15,8 \pm 0,5^{Aa}$	$14,1 \pm 0,3^{Ab}$	$13,8 \pm 0,4^{Ab}$
	5	$16,2 \pm 0,6^{Aa}$	$15,7 \pm 0,5^{Ba}$	$14,3 \pm 0,5^{Bb}$
	9	$15,8 \pm 0,5^{Aa}$	$14,1 \pm 0,3^{Ab}$	$13,8 \pm 0,4^{Ab}$
	12	$15,8 \pm 0,9^{Aa}$	$14,5 \pm 0,6^{Ab}$	$14,0 \pm 0,2^{ABb}$
Inverno	0	$15,5 \pm 0,9^{Aa}$	$16,0 \pm 0,7^{Aa}$	$15,2 \pm 1,6^{Aa}$
	5	$15,0 \pm 0,6^{Aa}$	$14,5 \pm 0,8^{Ba}$	$13,0 \pm 0,5^{Bb}$
	9	$14,6 \pm 1,1^{Aa}$	$12,5 \pm 1,1^{Cb}$	$11,7 \pm 0,7^{Bb}$
	12	$14,6 \pm 1,7^{Aa}$	$12,8 \pm 1,1^{Cb}$	$12,5 \pm 1,6^{Bb}$
Primavera	0	$17,1 \pm 0,5^{Aa}$	$17,0 \pm 0,4^{Aa}$	$16,9 \pm 0,7^{Aa}$
	5	$17,0 \pm 0,3^{Aa}$	$16,9 \pm 0,4^{ABa}$	$16,5 \pm 0,4^{ABb}$
	9	$16,9 \pm 0,5^{ABa}$	$16,4 \pm 0,4^{Ba}$	$16,3 \pm 0,3^{Ba}$
	12	$16,4 \pm 0,4^{Ba}$	$16,3 \pm 0,4^{Ba}$	$16,1 \pm 0,3^{Ba}$

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma estação não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como para a luminosidade e o esverdeamento observou-se a influência da estação do ano no amarelecimento das folhas (Figura 9). Amostras coletadas durante o verão apresentaram valor de b^* maior do que as demais.

Figura 9 – Médias de b^* por dia, entre os três tratamentos, durante as quatro estações do ano.

Semelhante à presente pesquisa, Kim e Yook (2009) observaram redução nos valores de L^* e b^* e aumento nos valores de a^* em kiwis irradiados com 1, 2 e 3 kGy, o que não aconteceu com as amostras-controle durante o período de armazenamento.

Em estudo realizado por Gomes et al (2008), folhas de espinafre irradiadas com dose acima de 1,0 kGy demonstraram que não houve alteração de cor no início, porém após o 7º dia de análise, o valor de b^* foi significativamente mais alto, tornando a amostra mais amarela. O valor de a^* apresentou um aumento (decréscimo da cor verde), no entanto, não houve diferença entre as amostras irradiadas e a controle, até o 15º dia de armazenamento.

Diferente dos resultados obtidos na presente pesquisa, em abacaxi minimamente processado e irradiado com 2 kGy, Hajare et al (2006) observaram variação na coloração das amostras durante os 12 dias de armazenamento. Os valores de L^* , a^* e b^* não apresentaram mudanças significativas entre as amostras irradiadas e as não irradiadas, porém o período de armazenamento provocou

alterações nesses valores. Já para lichia, esses mesmos autores observaram escurecimento do pericarpo quando a fruta foi exposta a 0,3 e 0,5 kGy, o que não ocorreu com as amostras-controle. Dhanya et al (2009), por outro lado não observaram diferença significativa na coloração de amostras de açafrão irradiadas com 1, 3, 5 e 7 kGy.

Apesar das alterações estatisticamente significativas nos valores de L^* , a^* e b^* , não houve interferência na aceitação do produto pelos provadores durante a análise sensorial, uma vez que essas alterações não foram notadas pelos mesmos.

4.5. Determinação do conteúdo de ácido ascórbico, dehidroascórbico e vitamina C total nas amostras de espinafre durante 12 dias de armazenamento a $(4\pm1)^\circ\text{C}$.

A vitamina C é um antioxidante abundante em muitos vegetais e é fundamental no processo de fotossíntese, fotoproteção, crescimento de parede celular, resistência a fatores ambientais e na síntese de etileno, giberelinas, antocianinas, hidroxiprolina e hidroxilisina (SMIRNOFF; WHEELER, 2000).

Na presente pesquisa, avaliamos o conteúdo de ácido ascórbico e dehidroascórbico em amostras de espinafre expostos à radiação gama nas doses de 1,0 e 1,5 kGy, assim como nas amostras não irradiadas, e armazenados a $(4\pm1)^\circ\text{C}$ por 12 dias. As análises foram realizadas nas quatro estações do ano. Porém, através da metodologia utilizada não foi possível detectar o conteúdo de ácido ascórbico e de dehidroascórbico nas amostras, irradiadas ou não, em todos os períodos analisados, ou seja, o conteúdo de vitamina C das amostras está provavelmente, abaixo do limite de detecção ($<5\text{mg}/100\text{g}$)

De acordo com a literatura, o espinafre é rico em vitamina C, porém os dados encontrados são para o espinafre americano (*Spinacia oleracea*), que contém entre 30,4 e 91,6 mg/100 g de ácido ascórbico total (CITAK; SONMEZ, 2010; LESTER; HALLMAN, 2010). O espinafre avaliado na presente pesquisa é o chamado espinafre da Nova Zelândia (*Tetragonia expansa*), que pode ser cultivado em países com clima quente, como o Brasil. Esses gêneros de espinafre apresentam características físicas diferentes, assim como devem apresentar concentrações diferentes em seus nutrientes. Ao contrário do que ocorre com o espinafre

americano, há escassez de dados com relação à composição do espinafre cultivado no Brasil.

4.6. Quantificação de flavonoides, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em espinafre minimamente processado irradiado e armazenado a (4 ± 1) °C por 12 dias

O interesse por alguns antioxidantes presentes em alimentos, particularmente, os compostos fenólicos, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos, vem aumentando devido aos benefícios que promovem à saúde com o seu consumo regular através da dieta, como a redução do risco de desenvolvimento de câncer e de doenças cardiovasculares. No entanto, o processamento tecnológico desses alimentos pode provocar alterações na concentração desses compostos quando comparado ao alimento não minimamente processado.

O conteúdo de compostos fenólicos totais nas amostras de espinafre variou entre 73 e 133 mg GAE eq/100g, quando avaliadas nas diferentes estações do ano (Tabela 10). As amostras coletadas na primavera apresentaram maior conteúdo desses compostos (133mg GAE eq/100g), enquanto as coletadas no verão apresentaram menor conteúdo (73 mg GAE eq/100g). Apesar de se observar diferenças significativas entre o controle e as amostras irradiadas ($p < 0.05$), não se observa um padrão de variação. O teor de fenólicos totais nas amostras coletadas no verão e no outono foi significativamente maior nas irradiadas com 1,5 kGy no dia zero quando comparadas às demais. O mesmo pode ser observado nas amostras irradiadas com 1 kGy coletadas no inverno (Tabela 10). Observa-se também significativo ($p < 0.05$) decréscimo no conteúdo desses compostos durante o período de armazenamento, de aproximadamente 10% após 12 dias, porém sem grande diferença entre os tratamentos e o respectivo controle.

Tabela 10 – Teor de fenólicos totais (mg ácido gálico eq./100 g b.u.) em amostras de espinafre (*Tetragonia expansa*) submetidas ou não a tratamento por irradiação, coletadas nas quatro estações do ano de 2012, armazenadas a (4±1) °C por 12 dias.

Estação	Dia	Tratamentos		
		Controle	1,0 kGy	1,5 kGy
Verão	0	73 ± 4 ^{A a}	60 ± 3 ^{A b}	81 ± 5 ^{A c}
	5	74 ± 3 ^{A a}	59 ± 3 ^{A b}	73 ± 4 ^{B a}
	9	68 ± 2 ^{B a}	61 ± 1 ^{A a}	85 ± 3 ^{A b}
	12	68 ± 2 ^{B a}	56 ± 2 ^{A b}	74 ± 1 ^{B c}
Outono	0	83 ± 2 ^{A a}	76 ± 3 ^{A b}	102 ± 2 ^{A c}
	5	85 ± 2 ^{A a}	70 ± 3 ^{A b}	78 ± 1 ^{B c}
	9	90 ± 2 ^{B a}	82 ± 3 ^{A b}	91 ± 3 ^{C a}
	12	89 ± 3 ^{B a}	97 ± 2 ^{B b}	78 ± 5 ^{B c}
Inverno	0	99 ± 3 ^{A a}	126 ± 4 ^{A b}	95 ± 2 ^{A a}
	5	102 ± 2 ^{A a}	119 ± 4 ^{A b}	97 ± 13 ^{A a}
	9	98 ± 1 ^{A a}	91 ± 4 ^{B a b}	90 ± 3 ^{A b}
	12	98 ± 3 ^{A a}	102 ± 4 ^{C a}	99 ± 8 ^{A a}
Primavera	0	133 ± 5 ^{A a}	109 ± 4 ^{A b}	110 ± 4 ^{A b}
	5	103 ± 4 ^{B a}	100 ± 3 ^{B a}	109 ± 5 ^{A C a}
	9	106 ± 5 ^{B a}	96 ± 7 ^{B b}	92 ± 3 ^{B b}
	12	110 ± 7 ^{B a}	98 ± 12 ^{B b}	99 ± 7 ^{B C b}

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma estação do ano não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A capacidade antioxidante, avaliada pelo método de DPPH, das amostras de espinafre variou entre 178 e 476 µmol Trolox eq./100g amostra (Tabela 11). Assim como para o conteúdo de compostos fenólicos totais, as amostras coletadas no verão apresentaram menor capacidade antioxidante (178 µmol Trolox eq./100g), enquanto as coletadas na primavera apresentaram maior capacidade antioxidante (476 µmol Trolox eq./100g), quando comparadas com as demais estações do ano. Acompanhando o padrão de decréscimo ocorrido no conteúdo de compostos fenólicos totais, a capacidade antioxidante apresentou uma variação entre 10 e 25% após 12 dias de estocagem.

É possível constatar que há diferenças estatisticamente significantes na capacidade antioxidante das amostras-controle e das irradiadas, coletadas nas diferentes estações do ano. A capacidade antioxidante foi maior nas amostras irradiadas do que nas controle, para as coletadas no verão e no inverno.

Os compostos fenólicos totais apresentaram forte correlação ($r=0.68$) (função Pearson) com a capacidade antioxidante pelo método de DPPH. O coeficiente de correlação (r) mostra a intensidade da associação entre as duas variáveis envolvidas. Valores de r entre 0,9-1,0 significa uma correlação muito forte, entre 0,6-0,9 correlação forte, entre 0,3-0,6 correlação regular e entre 0,0-0,3 fraca correlação (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Tabela 11 – Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox eq./100 g b.u.}$) em amostras de espinafre (*Tetragonia expansa*) submetidas ou não a tratamento por irradiação, coletadas nas quatro estações do ano de 2012, armazenadas a $(4\pm1)^\circ\text{C}$ por 12 dias.

Estação	Dia	Tratamentos		
		Controle	1,0 kGy	1,5 kGy
Verão	0	178 ± 7^{Aa}	272 ± 7^{Ab}	203 ± 17^{Ac}
	5	190 ± 7^{Aa}	276 ± 16^{Ab}	177 ± 10^{Ba}
	9	153 ± 6^{Ba}	281 ± 21^{Ab}	232 ± 18^{Cc}
	12	152 ± 7^{Ba}	247 ± 8^{Bb}	201 ± 16^{Ac}
Outono	0	367 ± 21^{Aa}	269 ± 12^{Ab}	374 ± 14^{Aa}
	5	351 ± 28^{Aa}	302 ± 15^{Bb}	283 ± 12^{Bc}
	9	403 ± 26^{Ba}	359 ± 33^{Cb}	388 ± 17^{Ac}
	12	361 ± 23^{Aa}	358 ± 15^{Ca}	447 ± 26^{Cb}
Inverno	0	365 ± 9^{Aa}	401 ± 15^{Ab}	375 ± 18^{Aa}
	5	328 ± 12^{Ba}	383 ± 17^{Ab}	295 ± 20^{Bc}
	9	257 ± 11^{Ca}	281 ± 10^{Bb}	284 ± 12^{Bb}
	12	233 ± 6^{Ca}	300 ± 7^{Bb}	281 ± 18^{Bb}
Primavera	0	476 ± 20^{Aa}	419 ± 34^{Ab}	469 ± 24^{Aa}
	5	402 ± 18^{Ba}	408 ± 16^{Aa}	455 ± 30^{Bb}
	9	391 ± 24^{Ba}	383 ± 15^{Ba}	383 ± 15^{Ca}
	12	402 ± 18^{Ba}	358 ± 27^{Cb}	422 ± 18^{Dc}

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para a mesma estação do ano não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Enquanto em alguns vegetais, a irradiação aumenta a capacidade antioxidante, em outros ela promove redução, como demonstrado por Fan (2005) e por Fan e Sokorai (2011). Fan (2005) constatou o aumento na capacidade antioxidante e no conteúdo de compostos fenólicos presentes em alface e endívia quando expostas a 2 kGy. Por outro lado, Fan e Sokorai (2011) verificaram que doses entre 1 e 4 kGy provocaram a redução na capacidade antioxidante de

espinafre (*Spinacia oleracea*), enquanto o conteúdo de compostos fenólicos não foi alterado. Como na presente pesquisa, os autores também observaram a redução nos teores de compostos fenólicos ao longo dos 14 dias de armazenamento a 4°C.

Os flavonóides identificados nas amostras de espinafre foram as agliconas flavonas: apigenina (Apg) e a luteolina (Lut) (Figura 10) e, entre as agliconas, cinco derivados de apigenina e um derivado de luteolina (Figura 11A). Foram também detectados quatro picos de derivados do ácido hidroxicinâmico, sendo um deles na fração eluída com metanol:amônia (Figura 11A e 11B).

Figura 10 – Estrutura dos flavonoides encontrados no espinafre (*Tetragonia expansa*).

Figura 11 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD (328 nm) de amostra de espinafre (*Tetragonia expansa*). (A) fração eluída com metanol após SPE e (B) fração eluída com metanol amônia após SPE. Picos identificados como (1) derivados do ácido hidroxicinâmico, (2) derivados de apigenina, (3) derivado de luteolina.

Estudos sobre o teor de flavonoides têm sido realizados com o “espinafre verdadeiro”. Nesse gênero, os flavonoides encontrados são: 5,3',4'-tri-hidroxi-3-metoxi-6:7-metileno-dioxi-flavona-4'-glucuronidio, spinatosidio-4'-glucuronidio,

-patuletina, spinacetina, jaceidina (KIDMOSE et al., 2001; BERGQUIST et al., 2005), e os ácidos: orto e para-cumárico, e o ferúlico (BUNEA et al, 2008), diferente dos encontrados no presente estudo para o espinafre *Tetragonia expansa*, com exceção da apigenina que está presente nos dois tipos de espinafre.

A Tabela 12 mostra a concentração dos flavonoides encontrados nas amostras de espinafre irradiadas (1,0 e 1,5 kGy) e não-irradiadas, durante o período de armazenamento. Essas análises foram realizadas no outono, apenas para identificação dos flavonoides presentes nesse tipo de espinafre, bem como a ação da radiação na sua concentração.

Tabela 12 – Concentração de flavonoides (mg/100 g bu) e derivados do ácido hidroxicinâmico (mg ácido clorogênico eq./100 g bu). Amostragem, outono 2012.

Flavonoides / Tratamentos	Período de Armazenamento (dias)			
	0	5	9	12
Apigenina				
Controle	1.32 ± 0.33 ^{Aa}	1.33 ± 0.15 ^a	3.46 ± 1,45 ^b	–
1,0 kGy	0.96 ± 0.22 ^{A,Ba}	–	–	0.84 ± 0.14 ^{a,A}
1,5 kGy	0.39 ± 0.2 ^{Ba}	–	–	0.24 ± 0.07 ^{a,A}
Luteolina				
Controle	traços	traços	traços	–
1,0 kGy	nd*	–	–	nd*
1,5 kGy	nd*	–	–	nd*
Ácido hidroxicinâmico				
Controle	2.54 ± 0.65 ^{Aa}	2.63 ± 0.48 ^a	3.20 ± 0.15 ^b	–
1,0 kGy	3.20 ± 0.29 ^{Ba}	–	–	1.57 ± 0.51 ^{Ab}
1,5 kGy	1.21 ± 0.22 ^{Ca}	–	–	1.22 ± 0.03 ^{Aa}

* _ não detectado.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se aumento significativo na concentração de apigenina e ácido hidroxicinâmico após o 9º dia de estocagem em amostras de espinafre não irradiadas (Tabela 12). Após a aplicação de 1,0 e 1,5 kGy ocorreu um decréscimo na

concentração de apigenina. Esse decréscimo pode ser decorrente da redução na expressão enzimática da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) devido ao congelamento das amostras logo após o processo de irradiação ou pelo consumo dos flavonoides após o processo, devido à formação de radicais livres.

Os resultados do presente trabalho são concordantes com os obtidos por Breitfellner, Solar e Sontag (2002) que constataram a redução no conteúdo de flavonoides em morangos expostos a dose de 3 kGy, dose esta aprovada em muitos países para ser aplicada nesse alimento (INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP OF FOOD IRRADIATION, 1994).

Por outro lado, a irradiação pode estimular a síntese de flavonoides, através da indução da atividade enzimática da PAL, responsável pela síntese dessas substâncias, provocado pelo estresse causado por essa tecnologia (BHAT; SRIDHAR; YOKOTANI, 2007), como observado por Nunes et al. (2008), que constataram aumento na concentração dos flavonoides kampferol e quercetina em amostras de rúcula irradiadas com 1 e 2 kGy. Esse mesmo aumento foi observado por Vanamala et al (2005) em *grapefruit* irradiada com 300 Gy, onde a concentração dos flavonoides naringina e narirutina aumentou e por KANAZAWA et al. (2012), onde a concentração de flavonoides em vegetais irradiados também apresentou aumento após seis dias de armazenamento em geladeira após exposição a radiação UV-B.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa, podemos concluir que o processo de irradiação mostrou-se eficaz para a melhoria da segurança microbiológica de espinafre (*Tetragonia expansa*) minimamente processado, quando armazenado a (4 ± 1) °C sem afetar a aceitação do produto, mesmo após a aplicação de 1,5 kGy

Quimicamente, o processo reduziu a concentração de flavonoides, porém a concentração de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante da hortaliça não sofreram alterações. O que se constatou foi uma maior influência das estações do ano no teor desses compostos do que ação da radiação gama.

Portanto, o processo de irradiação mostrou ser uma ótima alternativa para a segurança microbiológica desde que associado às Boas Práticas de Fabricação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERS, M.L.; MAHON, B.E.; LEAHY, E.; GOODE, B.; DAMROW, T.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; RICE, D.H.; BARRETT, T.J.; HUTWAGNER, L.; GRIFFIN, P.M.; SLUTSKER, L. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, n.6, p.1588-1593, 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução RDC n.21, 2001**. Regulamento técnico para irradiação de alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/791ccc804a9b6b1b9672d64600696f00/Resolucao_RDC_n_21_de_26_de_janeiro_de_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 jun. 2012.

ALLENDE, A.; MCEVOY, J.L.; LUO, Y.; ARTES, F.; WANG, C.Y. Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed “Red Oak Leaf” lettuce. **Food Microbiology**, v.23, n.3, p.241-249, 2006.

AURELI, P.; FIORUCCI, G.C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SALMSAO, S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **New England Journal of Medicine**, v.342, p.1236-1241, 2000.

BARI, M.L.; AL-HAQ, M.I.; KAWASAKI, T.; NAKAUMA, M.; TODORIKI, S.; KAWAMOTO, S.; ISSHIKI, K. Irradiation to kill *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on ready-to-eat radish and mung bean sprouts. **Journal of Food Protection**, v.67, p.2263–2268, 2004.

BARI, M.L.; NAKAUMA, M.; TODORIKI, S.; JUNEJA, V.K.; ISSHIKI, K.; KAWAMOTO, S. Effectiveness of irradiation treatments in inactivating *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables at refrigeration temperature. **Journal of Food Protection**, v.68, n.2, p.318-323, 2005.

BERGQUIST, S.A.M.; GERTSSON, U.E.; KNUTHSEN, P.; OLSSON, M.E. Flavonoids in baby spinach (*Spinacea oleracea* L.): Changes during plant growth and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.9459-9464, 2005.

BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.59, n.2, p.204-216, 1996

BEUCHAT, L.R. **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review.** Geneva: Food Safety Unit: World Health Organization, 1998. 42p. (Food safety issues, WHO/FSF/FOS/98.2). Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2009.

BEUCHAT, L.R. **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review.** Georgia: WHO/FSF/FOS/98.2, 2002. 42p. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 18 dez. 2009>.

BHAT, R.; SRIDHAR, K.R.; YOKOTANI, K.T. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pnuriens*). **Food Chemistry**, v.103, p.860-866, 2007.

BIB, N.; KHAN, M.; BADSHAH, A.; CHAUDRY, M.A. Sensory, physicochemical and microbiological quality of irradiated minimally processed cauliflower. **Radiation Physics and Chemistry**, v.73, p.362-364, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v.28, 25-30, 1995.

BREITFELLNER, F.; SOLAR, S.; SONTAG, G. Radiation induced chemical changes of phenolic compounds in strawberries. **Radiation Physics and Chemistry**, v.67, p.497-499, 2003.

BUCKRIESER, C.; RUSNIOK, C.; KUNST, F.; COSSAT, P.; GLASER, P. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution pathogenicity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, n.3, p.207-213, 2003.

BUNEA, A.; ANDJELKOVIC, M.; SOCACIU, C.; BOBIS, O.; NEACSU, M.; VERHÉ, R. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Food Chemistry**, 108, p.649–656, 2008.

CAMARGO FILHO, W.P.; OLIVEIRA, A.C. **Perfil da olericultura no Brasil e em São Paulo, 2011.** 2012. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/estudos_lupa.php>. Acesso em: 05 dez. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts -- Michigan and Virginia, June-July 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.46, n.32, p.741-744, 1997. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00048994.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Outbreaks of *Salmonella* infections associated with eating Roma tomatoes – United States and Canada, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.54, n.13, p.325-328, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5413a1.htm>>. Acesso em: 04 jan. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.55, n.38, p.1045–1046, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5538a4.htm>>. Acesso em: 29 jun. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *E. coli* Infection [*Escherichia coli* Infection]. *E. coli* Outbreaks. 2010. Shredded Romaine Lettuce from a Single Processing Facility - *E. coli* O145. **Investigation update**: multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility. 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html>. Acesso em: 29 jun. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *E. coli* Infection [*Escherichia coli* Infection]. *E. coli* Outbreaks. 2011. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with In-shell Hazelnuts. **Investigation update**: multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with in-shell hazelnuts. 2011a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/hazelnuts0157/index.html>. Acesso em: 18 nov. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. About CDC: Newsroom. Release and Announcement Archive. 2011: Press Releases. June 7, 2011b. **No progress in *Salmonella* during past 15 years**: food safety annual report card targets hard-to-prevent infection. Disponível em: <http://www.cdc.gov/media/releases/2011/p0607_vitalsigns.html>. Acesso em: 29 jun. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella* Infection [Salmonellosis]. *Salmonella* Outbreaks. Cantaloupe – *Salmonella* Panama. June 23, 2011 (FINAL Update). **Investigation update:** multistate outbreak of *Salmonella* Panama infections linked to cantaloupe. *Salmonella*, 23 junho de 2011c. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/panama0311/062311/index.html>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella* Infection [Salmonellosis]. *Salmonella* Outbreaks. Whole, Fresh Imported Papayas – *Salmonella* Agona. August 29, 2011 (FINAL Update). **Investigation update:** multistate outbreak of human *Salmonella* Agona infections linked to whole, fresh imported papayas. 29 de ago. 2011d. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/agona-papayas/082911/index.html>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Listeria* Infection [Listeriosis]. Outbreaks. *Listeriosis* Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. October 18, 2011. **Investigation update:** multistate outbreak of listerioses linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. 2011e. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/101811/index.html>>. Acesso em: 19 out 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella* Infection [Salmonellosis]. *Salmonella* Outbreaks. Turkish Pine Nuts – *Salmonella* Enteritidis. November 17, 2011 (FINAL Update). **Investigation update:** multistate outbreak of human *Salmonella* Enteritidis infections linked to Turkish pine nuts. 17 nov. 2011f. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/pinenuts-enteritidis/111711/index.html>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *E. coli* Infection [*Escherichia coli* Infection]. *E. coli* Outbreaks. 2012. **Multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to organic spinach and spring mix blend (final update).** 2012a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O157H7-11-12/index.html>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella* Infection [Salmonellosis]. *Salmonella* Outbreaks. 2012. Cantaloupe – *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport. **Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport infections linked to cantaloupe (final update).** *Salmonella*, 5 outubro de 2012b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/index.html>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella* Infection [Salmonellosis]. *Salmonella* Outbreaks. 2012. Mangoes – *Salmonella* Braenderup. **Multistate outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with mangoes (update final)**. 2012c. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-12/index.html>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Surveillance for foodborne disease outbreaks — United States, 2009–2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.62, n.3, p.41-47, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6203a1.htm?s_cid=mm6203a1_w>. Acesso em: 28 jan. 2013.

CHINEN, I.; EPSZTEYN, S. MELAMED, C.L.; AGUERRE, L.; MARTÍNEZ ESPINOSA, E.; MOTTER, M.M.; BASCHKIER, A.; MANFREDI, E.; MILIWEBSKY, E.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 on beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, n.2/3, p.167-171, 2009.

CITAK, S.; SONMEZ, S. Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacia oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. **Scientia Horticulturae**, n.126, p.415-420, 2010.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - CNEN. **Aplicações da energia nuclear**: apostila educativa. Rio de Janeiro: CNEN, [s.d.]. 18p. Disponível em: <<http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/aplica.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2011.

CORDANO, A.M.; JACQUET, C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.176–179, 2009.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v.26, p.1001–1043, 2009.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007. cap.10, p.187-236.

DE JONG, B.; ÖBERG, J.; SVENUNGSSON, B. Outbreak of salmonellosis in a restaurant in stockholm, Sweden, September – October 2006. **EuroSurveillance**, v.12, n.11, p.E13-E14, 01 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=749>>. Acesso em: 29 ju. 2011.

DELAQUIS, P. Fresh-cut vegetables. In: SAPERS, G.M.; GORNY, J.R.; YOUSEF, A.E., eds. **Microbiology of fruits and vegetables**. Boca Raton: CRC Press, 2005. cap.11, p.253-265.

DHANYA, R.; MISHRA, B.B.; KHALEEL, K.M.; CHERUTH, A.J. Shelf life extension of fresh turmeric (*Cucuma longa* L.) using gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.78, p.791-795, 2009.

DHOKANE, V.S.; HAJARE, S.; SHASHIDAR, R.; SHARMA, A.; BANDEKAR, J.R. Radiation processing to ensure safety of minimally processed carrot (*Daucus carota*) and cucumber (*Cucumis sativus*): optimization of dose for the elimination of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.69, n.2, p.444–448, 2006.

DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1995. 454p.

DINELLI, G.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; MAROTTI, I.; CATIZONE, P.; MAZZANTI, A. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. **Food Chemistry**, v.90, p.105–114, 2006.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p.173-175, 2003.

DONTOROU, C.; PAPADOPOULOU, C.; FILIOUSSIS, G.; ECONOMOU, V.; APOSTOLOU, I.; ZAKKAS, G.; SALAMOURA, A.; KANSOUZIDOU, A.; LEVIDIOTOU, S. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece **International Journal of Food Microbiology**, v.82, n.3, p.273-279, 2003.

FAN, X. Antioxidant capacity of fresh-cut vegetables exposed to ionizing radiation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, n.6, p.995-1000, 2005.

FAN, X.; NIEMIRA, B.A.; SOKORAI, K.J.B. Sensorial, nutritional and microbiological quality of fresh cilantro leaves as influenced by ionizing radiation and storage. **Food Research International**, v.35, p.713-719, 2003a.

FAN, X.; NIEMIRA, B.A.; SOKORAI, K.J.B. Use of ionizing radiation to improve sensory and microbial quality of fresh-cut green onion leaves. **Journal of Food Science**, v.68, n.4, p.1478-1483, 2003b.

FAN, X.; TOIVONEN, P.M.A.; RAJKOWSKI, K.T.; SOKORAI, K.J.B. Warm water treatment in combination with modified atmosphere packaging reduces undesirable effects of irradiation on the quality of fresh-cut iceberg lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1231-1236, 2003.

FAN, X.; SOKORAI, K.J.B. Retention of quality and nutritional value of 13 fresh-cut vegetables treated with low-dose radiation. **Journal of Food Science**, v.73, n.7, p.S367-S372, 2008.

FAN, X.; SOKORAI, K.J.B. Changes in quality, liking, and purchase intent of irradiated fresh-cut spinach during storage. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.S363-S368, 2011

FAN, X. Radiation chemistry of food components. In: SOMMERS, C.H.; FAN, X., eds **Food irradiation research and technology**. 2.ed. Oxford: Willey-Blackwell, 2012. cap.6, p.75-92.

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, n.3, p.189-204, 1998.

FLEMING, H.P.; McFEETERS, R.F.; BREIDT, F. Fermented and acidified vegetables. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.51, p.526.

FOLEY, D.; EUPER, M.; CAPORASO, F.; PRAKASH, A. Irradiation and chlorination effectively reduces *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on cilantro (*Coriandrum sativum*) without negatively affecting quality. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2092–2098, 2004.

FRANCIS, G.A.; THOMAS, C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v.34, p.1-22, 1999.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 307p.

FRÖDER, H.; MARTINS, C.G.; SOUZA, K.L.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.; DESTRO, M.T. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. **Journal of Food Protection**, v.70, p.1277–1280, 2007.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. **Estações do ano**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/estacoes-ano.htm>. Acesso em: 20 mar. 2013.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; OLIVEIRA, C.A.F. Qualidade dos vegetais. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4.ed. Barueri: Manole, 2011. cap.9, p.185-201.

GOMES, C.; MOREIRA, R.G.; CASTELL-PEREZ, M.E.; KIM, J.; SILVA, P.; CASTILLO, A. E-Bean irradiation of bagged, ready-to-eat spinach leaves (*Spinacea oleracea*). **Journal of Food Science**, v.73, p.E95-E102, 2008.

GOULARTE, L.; MARTINS, C.G.; MORALES-AIZPURÚA, I.C.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M.; VIZEU, D.M.; HUTZLER, B.W.; LANDGRAF, M. Combination of minimally processing and irradiation to improve the microbiological safety of lettuce (*Lactuca sativa*, L). **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, p.155-159, 2004.

GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F., eds. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.289-293.

HAJARE, S.N.; DHOKANE, V.S.; SHASHIDHAR, R.; SAROJ, S.; SHARMA, A.; BANDEKAR, J.R. Radiation processing of minimally processed pineapple (*Ananas comosus* Merr.): effect on nutritional and sensory quality. **Journal of Food Science**, v.71, n.6, p.S501-S505, 2006.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus Nigra* L.) growing in Brazil. **Food Science and Technology International**, v.13, p.17-25, 2007.

HO, C.T.; RAFI, M.M.; GHAI, G. Substâncias bioativas: nutracêuticas e tóxicas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap.12, p.585-608. (Biblioteca Artmed. Nutrição e tecnologia de alimentos).

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HSU, W.-Y.; SIMONNE, A.; JITAREERAT, P.; MARSHALL Jr., M.R. Low-dose irradiation improves microbial quality and shelf life of fresh mint (*Mentha piperita* L.) without compromising visual quality. **Journal of Food Science**, v.75, n.4, p.222-230, 2010.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. **Food irradiation with emphasis on process control and acceptance in Asia**. [S.l.]: IAEA, 2001. (IAEA TEC.DOC-871).

INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP OF FOOD IRRADIATION. **Irradiation of strawberries**: a compilation of technical data for its authorization and control. Viena: International Atomic Energy Agency, 1994. 37p.

KADER, A.A.; LIPTON, W.J.; MORRIS, L.L. Systems for scoring quality of harvested lettuce. **Hort Science**, v. 8, p. 408-409, 1973.

KANAZAWA, K.; HASHIMOTO, T.; YOSHIDA, S.; SUNGWON, P.; FUKUDA, S. Short photoirradiation induces flavonoid synthesis and increases its production in postharvest vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.60, p.4359-4368, 2012.

KANG, D.H.; FUNG, D.Y.C. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.62, n.11, p.1346–1349, 1999.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KAWASHIMA, L.M.; VALENTE SOARES, L.M. Efeito do tempo de branqueamento na extração seletiva de elementos minerais do substituto de espinafre (*Tetragonia expansa*) comumente empregado no Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.25, n.3, p.419-424, 2005.

KIDMOSE, U.; KNUTHSEN, P.; EDELENBOS, M.; JUSTESEN, U.; HEGELUND, E. Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes after deep frozen storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.918-923, 2001.

KIM, J.-H.; LEE, J.-W.; KIM, J.-H.; SEO, J.-H.; HAN, S.-B.; CHUNG, H.-J.; BYUN, M.-W. Effect of gamma irradiation on *Listeria ivanovii* inoculated to iceberg lettuce stored at cold temperature. **Food Control**, v.17, p.397-401, 2006.

KIM, K.H.; YOOK, H.S. Effect of gamma irradiation on quality of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward). **Radiation Physics and Chemistry**, v.78, p.414-421, 2009.

KONIKA MINOLTA. **Precise color communications: color control from feeling to instrumentation**. Osaka: Minolta, 1994. 49p.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliformes, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.8, p.69-82.

LACROIX, M.; OUATTARA, B. Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products: a review. **Food Research International**, v.33, p.719-724, 2000.

LEE, N.Y.; JO, C.; SHIN, D.H.; KIM, W.G.; BYUN, M.W. Effect of γ -irradiation on pathogens into ready-to-use vegetables. **Food Microbiology**, v.23, n.7, p.649-656, 2006.

LESTER, G.E.; HALLMAN, G.J. γ -Irradiation dose: effects on baby-leaf spinach ascorbic acid, carotenoids, folate, α -tocopherol and phyloquinone concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.58, p.4901-4906, 2010.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v.16, p.77–84, 2005.

MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F., eds. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.271-279.

MARTINS, C.G.; BEHRENS, J.H.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M.; VIZEUA, D.M.; HUTZLER, B.; LANDGRAF, M. Gamma radiation in the reduction of *Salmonella* spp. inoculated on minimally processed watercress (*Nasturtium officinalis*). **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, p.87-91, 2004.

MARTINS, C.G.; BEHRENS, J.H.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; VIEIRA, V.S.; COSTA-SOBRINHO, P.S.; VIZEU, D.M.; HUTZLER, B.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M. Shelf life of irradiated minimally processed (MP) watercress (*Nasturtium officinale*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.44-48, 2007.

MARTINS, C.G. **Efeitos da radiação gama na microbiota e no teor de vitamina C de agrião (*Nasturtium officinale*) orgânico minimamente processado**: aceitação e intenção de compra do produto irradiado. São Paulo, 2008. 103p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MARTINS, C.G.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; BEHRENS, J.H.; SOUZA, K.L.O.; VIZEU, D.M.; HUTZLER, B.W.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M. Acceptability of minimally processed and irradiated pineapple and watermelon among Brazilian consumers. **Radiation Physics Chemistry**, v.77, p.825-829, 2008.

McCANN, M.J.; GILL, C.I.R.; O'BRIEN, G.; RAO, J.R.; McROBERTS, W.C.; HUGHES, P.; McENTEE, R.; ROWLAND, I.R. Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.7, p.1224-1230, 2007.

MOLINS, R.A., ed. **Food irradiation**: principles and applications. New York: Wiley-Interscience, 2001. 469p.

MORETTI, C.L.; MACHADO, C.M.M. Aproveitamento de resíduos sólidos do processamento mínimo de frutas e hortaliças. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4; SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE VEGETAIS FRESCOS CORTADOS, 1, São Pedro, 2006. **Anais**. Piracicaba: USP/ESALQ, 2006. p.25-32.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.7, p.63-67.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seed. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.123-153, 1999.

NEAL, J.A.; BOOREN, B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; MILLER, R.K.; LUCIA, L.M.; MAXIM, J.E.; CASTILLO, A., 2010. Shelf life and sensory characteristics of baby spinach subjected to electron beam irradiation. **Journal of Food Science**, v.75, p.S319–S326, 2010.

NIEMIRA, B.A.; SOMMERS, C.H.; FAN, X. Suspending lettuce type influences recoverability and radiation sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.65, n.9, p.1388–1393, 2002.

NIEMIRA, B.A. Radiation sensitivity and recoverability of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* on 4 lettuce types. **Journal of Food Science**, v.68, p.2784-2787, 2003.

NIEMIRA, B.A.; FAN, X.; SOKORAI, J.B.; SOMMERS, C.H. Ionizing radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 and *Listeria innocua* ATCC 51742 inoculated on endive (*Chicoria endiva*). **Journal of Food Protection**, v.66, p.993–998, 2003.

NIEMIRA, B.A. Relative efficacy of sodium hypochlorite wash vs. irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of romaine lettuce and baby spinach. **Journal of Food Protection**, v.70, n.11, p.2526–2532, 2007.

NIEMIRA, B.A. Irradiation compared with chlorination for elimination of *Escherichia coli* O157:H7 internalized in lettuce leaves: Influence of lettuce variety. **Journal of Food Science**, v.73, n.5, p.M208-M213, 2008.

NUNES, T.P. **Efeito da irradiação combinada à embalagem em atmosfera modificada na qualidade de rúcula (*Eruca sativa* Mill.) minimamente procesada**. São Paulo, 2008. 111p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

NUNES, T.P.; MARTINS, C.G.; BEHRENS, J.H.; SOUZA, K.L.O.; GENOVESE, M.I.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M. Radioresistance of *Salmonella* species and *Listeria monocytogenes* on minimally processed arugula (*Eruca sativa* Mill.): effect of irradiation on flavonoid content and acceptability of irradiated produce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.4, p.1264-1268, 2008.

NYGÅRD, K.; LASSEN, J.; VOLD, L.; AAVITSLAND, P. E-alert: outbreak of *Salmonella* Thompson infections caused by contaminated rucola (rocket) salad. **EuroSurveillance**, v.8, n.48, 25 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2594>>. Acesso em: 29 jun. 2011.

PAINTER, J.; SLUTSKER, L. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H., eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.85-109.

PAPETTI, A.; DAGLIA, M.; ACETI, C.; SORDELLI, B.; SPINI, V.; CARRAZZONE, C.; GAZZANI, G. Hydroxycinnamic acid derivatives occurring in *Cichorium endivia* vegetables. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48, p.472-476, 2008.

PASTERNAK, T.; POTTERS, G.; CAUBERGS, R.; JANSEN, M.A.K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.418, p.1991-2001, 2005.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. **LWT – Food Science and Technology**, v.40, p.1-11, 2007.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L.E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2005. v.2, p.764-799.

PRAKASH, A.; INTHAJAK, P.; HUIBREGTSE, H.; CAPORASO, F.; FOLEY, D.M. Effects of low-dose gamma irradiation and conventional treatments on shelf life and quality characteristics of diced celery. **Journal of Food Science**, v.65, p.1070-1075, 2000.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE. Outbreaks of *Salmonella* Typhimurium DT 204b infection in England and Wales and elsewhere in Europe. **EuroSurveillance**, v.4, n.39, 28 Sep. 2000. Disponível em: <<http://www.phls.org.uk/publications/CDR00/cdr3900.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

RADOMYSKY, T.; MURANO, E.A.; OLSON, D.G.; MURANO, P.S. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation. **Journal of Food Protection**, v.57, n.1, p.73-86, 1994.

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

RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.44, n.3, p.185-194, 2007.

RAJKOWSKI, K.T.; THAYER, D.W. Reduction of *Salmonella* spp and strains of *Escherichia coli* O157: H7 by gamma radiation of inoculated sprouts. **Journal of Food Protection**, v.63, p.871–875, 2000.

RAKOTONIRANY, A.M.; WANG, Q.; PADUA, G.W. Evaluation of zein films a modified atmosphere packaging for fresh broccoli. **Journal of Food Science**, v.66, p.1108-1111, 2001.

RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P.M.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982 – 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.4, p.603-609, 2005.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H., eds. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.1-20.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamento. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326p.

ROLLE, R.S.; CHISM, G.W. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, v.10, p.157-177, 1987.

RYAN, K.G.; SWINNY, E.E.; MARKHAM, K.R.; WINEFIELD, C. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. **Phytochemistry**, v.59, p.23–32, 2002.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p.343-353.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; WARD, L.; GILLESPIE, I.A.; MITCHELL, R.T. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retails establishments 19 uncovers a national outbreak of Salmonellosis. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.403-409, 2003.

SANTOS, J.S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Revisão: Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.1, p.1-14, 2012.

SCHLECH III, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v.308, n.4, p.203-206, 1983.

SHASHIDHAR, R.; DHOKANE, V.S.; HAJARE, S.N.; SHARMA, A.; BANDEKAR, J.R. Effectiveness of radiation processing for elimination of *Salmonella* Typhimurium from minimally processed pineapple (*Ananas comosus* Merr.). **Journal of Food Science**, v.72, n.3, p.M98-M101, 2007.

SMIRNOFF, N.; WHEELER, G.L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, n.4, p.267-290, 2000.

STRUELENS, M.J.; PALM, D.; TAKKINEN, J. Enteraggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak: new microbiological findings boost coordinated investigations by European public health laboratories. **EuroSurveillance**, v.16, n.24, 16 Jun. 2011. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19890>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chemistry**, v.108, p.879-884, 2008.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.

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

TSUHAKE, V.P. **Irradiação de alface (*Lactuca sativa* L.): aspectos microbiológicos e sensoriais**. São Paulo, 2005. 71p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **The Bad Bug Book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**, 1998. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>>. Acesso em: 08 fev. 2006.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **FDA finalizes report on 2006 spinach outbreak**, 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108873.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Irradiation: A Safe Measure for Safer Iceberg Lettuce and Spinach**. 2008, ago 22. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm093651.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. Campinas: UNICAMP, 2011. Versão 4. 161p. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

URBAIN, W.M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986. 315p. (Food science and technology).

VANAMALA, J.; COBB, G.; TURNER, N.D.; LUPTON, J.R.; YOO, K.S.; PIKE, L.M.; PATIL, B.S. Bioactive compounds of grapefruit (*Citrus paradise* cv. Rio red) respond differently to postharvest irradiation, storage, and freeze drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3980-3985, 2005.

VIEITES, R.L. **Conservação pós-colheita do tomate através do uso da radiação gama, cera e saco de polietileno, armazenados em condições de refrigeração e ambiente**. Botucatu, 1998. 131p. Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Agrônomicas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

WANI, A.M.; HUSSAIN, P.R.; MEENA, R.S.; DAR, M.A. Effect of gamma-irradiation and refrigerated storage on the improvement of quality and shelf life of pear (*Pyrus communis* L., Cv. Bartlett/William). **Radiation Physics and Chemistry**, v.77, p.983-989, 2008.

WHITWORTH, J. Shredded lettuce identified as source of *E. coli* outbreak. **Food Quality News**, 15 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.foodqualitynews.com/Food-Alerts/Shredded-lettuce-identified-as-source-of-E.coli-outbreak>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1996 - Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in Japan – Update. 28 August 1996. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/1996_08_28/en/>. Acesso em: 27 jun. 2011.

ZHANG, L.; LU, Z.; WANG, H. Effect of gamma irradiation on microbial growth and sensory quality of fresh-cut lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.348-351, 2006.

ANEXOS

Anexo A. Parecer de Aprovação concedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/79/2010
Protocolo CEP/FCF/553
CAAE: 0009.0.018.000-10

I - Identificação

Projeto de Pesquisa:	USO DA RADIAÇÃO IONIZANTE PARA A MELHORIA DA INOCUIDADE DE ESPINAFRE (<i>Tetragonia expansa</i>) MINIMAMENTE PROCESSADO
Pesquisador Responsável:	Ana Carolina B Rezende
Orientador:	Profa. Dra. Mariza Landgraf
Instituição:	FCF/USP
Área Temática Especial:	-
Patrocinadores:	-

II - Sumário Geral do Protocolo

O espinafre (*Tetragonia expansa*) é um vegetal comumente consumido pela população brasileira, sendo uma boa fonte de minerais, vitaminas, especialmente vitaminas C e E. Sabe-se que produtos vegetais *in natura* podem veicular microrganismos patogênicos, sendo os responsáveis por surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Nos últimos anos, vegetais têm sido responsáveis por surtos de DTA em diversas regiões do mundo por veicularem os mais diferentes microrganismos patogênicos. O uso de sanitizantes nem sempre reduz de maneira significativa a população de microrganismos presentes nos vegetais, sendo necessária a aplicação de técnicas mais eficientes. Entre essas, a irradiação vem recebendo especial consideração por se tratar de um processo que, dependendo da dose, não altera as características naturais do alimento e, ao mesmo tempo, reduz de maneira significativa a microbiota presente promovendo a inocuidade desse alimento e estendendo sua vida de prateleira. Deste modo, os objetivos do presente estudo são avaliar o efeito da irradiação na redução de *E. coli* produtora de toxina de Shiga, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* inoculadas em espinafre, bem como sobre os atributos físico-químicos e sensoriais do vegetal.

Objetivo Geral:

Avaliar o efeito da irradiação ionizante na redução da população de alguns microrganismos patogênicos em espinafre

Objetivos Específicos:

Avaliar a ação da irradiação em *Salmonella* spp., *E. coli* produtora de toxina de Shiga e *L. monocytogenes* em espinafre;

Investigar o efeito da irradiação sobre os atributos físico-químicos (cor e vitamina C);

Avaliar a qualidade sensorial do espinafre irradiado.

Descrição da Casuística:

Os espinafres serão analisados sensorialmente após serem expostos à irradiação para a avaliação da aceitabilidade. A avaliação de aceitabilidade será medida através de uma escala hedônica não estruturada de 10 cm, variando de extremamente desgostei (nota 0) a extremamente gostei (nota 10) (MARTINS, 2008). A equipe de provadores será composta de 30 membros não-treinados da faculdade, funcionários e estudantes da Universidade de São Paulo (USP), com idade entre 20 a 60 anos. Para o recrutamento dos provadores será

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

aplicado um questionário de seleção com base na disponibilidade de tempo, nas condições de saúde e apreciação do produto.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Indivíduos entre 18 e 60 anos, ser consumidor regular de espinafre, não possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância ou outro tipo de restrição (como doença crônica ou tratamento médico com uso de medicamentos que possam interagir com o alimento); não deve estar gripado, resfriado ou indisposto ou ter entrado em contato com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 08/07/2010.

São Paulo, 12 de julho de 2010.

O pesquisador deverá:

- Comunicar ao CEP:
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial em dezembro/2011 e relatório final em junho/2013.

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP