

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

**Aplicação de processos combinados - processamento mínimo
e radiação ionizante (^{60}Co) – visando o aumento da segurança
microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.)**

Laercio Goularte

***Tese para obtenção do Grau de
Doutor***

***Orientador:
Profa. Assoc. Mariza Landgraf***

São Paulo

2003

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

**Aplicação de processos combinados - processamento mínimo
e radiação ionizante (^{60}Co) – visando o aumento da segurança
microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.)**

Laercio Goularte

***Tese para obtenção do Grau de
Doutor***

***Orientador:
Profa. Assoc. Mariza Landgraf***

São Paulo

2003

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005417

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Goularte, Laercio

G694a Aplicação de processos combinados – processamento mínimo e radiação ionizante (^{60}Co) – visando o aumento da segurança microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.) / Laercio Goularte. -- São Paulo, 2003.
79p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Landgraf, Mariza

1. Microbiologia de alimentos 2. Irradiação : Vegetais : Tecnologia de alimentos 3. Salmonella : Bacteriologia 4. Escherichia : Bacteriologia I. T. II. Landgraf, Mariza, orientador.

664.07 CDD

Laercio Goularte

Aplicação de processos combinados - processamento mínimo e
radiação ionizante (^{60}Co)– visando o aumento da segurança
microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.)

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Assoc. Mariza Landgraf
Orientador/Presidente

Dr. Valter Arthur
1º Examinador

Dra. Valéria C. A. Junqueira
2º Examinador

Prof. Dr Dirceu Martins Vizeu
3º Examinador

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
4º Examinador

São Paulo, 01 de abril de 2003

AGRADECIMENTOS

À Profa. Assoc. Dra. Mariza Landgraf, pela orientação, confiança e apoio.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Profa. Dra. Bernadette D. G. Melo Franco, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Análise de Produtos S/C Ltda. - SFDK, na pessoa do Diretor Técnico Mario Killner pela disponibilização de materiais e equipamentos para o desenvolvimento do projeto e principalmente pelo constante incentivo no crescimento pessoal e profissional.

À EMBRARAD, nas pessoas da Diretora Beatriz Weltruan Hutzler Artel, do Gerente de Controle de Qualidade, Ary de Araújo de Rodríguez Jr, e do técnico Eduardo Antônio Grotti por tomarem viáveis os experimentos de irradiação.

À SADIA S/A – Laboratório Central, na pessoa da Dra. Suely M. K. Nakashima por viabilizar as análises sensoriais.

Ao painel de análise sensorial da SADIA S/A – Laboratório Central, pela colaboração, especialmente Sra. Éster Y. Yosino.

À Terra Brasil Horti Fruti Ltda., na pessoa do Diretor Cláudio Trabulsi pelo fornecimento de amostras de alface para alguns experimentos.

Às pesquisadoras, Profa. Dra. Maria Teresa Destro (FCF/USP) e Dra. Anna Lúcia C. H. Villavicencio (IPEN/USP) pelas sugestões e recomendações.

Aos técnicos do Laboratório de Análise de Produtos S/C Ltda. - SFDK, pela valiosa colaboração na execução de alguns experimentos.

À bibliotecária, Leila Aparecida Bonadio, da Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas, USP, pela revisão das referências bibliográficas.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com o projeto.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Materiais.....	15
3.1.1 Microrganismos.....	15
3.1.2 Alface	15
3.1.2.1 Avaliação microbiológica da alface americana disponível no mercado	15
3.1.2.2 Avaliação microbiológica durante o processamento mínimo da alface.....	16
3.1.2.3 Determinação do valor D ₁₀ de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> O157:H7 em alface americana processada refrigerada	17
3.1.2.4 Determinação da dose de irradiação máxima aceitável e determinação da vida de prateleira da alface irradiada	17
3.1.3 Fonte radioativa	18

3.2 Métodos	18
3.2.1 Análises microbiológicas	18
3.2.1.1 Preparo da diluição decimal seriada	18
3.2.1.2 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos	18
3.2.1.3 Contagem de microrganismos psicrotróficos	19
3.2.1.4 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	19
3.2.1.5 Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	20
3.2.1.6 Determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e fecais	20
3.2.1.7 Determinação do Número Mais Provável de <i>E. coli</i>	21
3.2.1.8 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	21
3.2.1.9 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	21
3.2.2 Método para a quantificação do cloro livre	22
3.2.3 Determinação do valor D_{10} para <i>Salmonella</i> e <i>E.coli</i> O157:H7 em alface americana	22
3.2.3.1 Ativação das culturas microbianas	23
3.2.3.2 Preparo em laboratório da alface minimamente processada	23
3.2.3.3 Preparo do inóculo	24
3.2.3.4 Contaminação da alface	24
3.2.3.5 Processo de irradiação	25
3.2.3.6 Enumeração dos microrganismos sobreviventes	26
3.2.3.7 Cálculo do valor de D_{10}	26
3.2.4 Efeito da irradiação sobre a alface americana minimamente processada	27
3.2.4.1 Determinação da dose de tolerância	27

3.2.4.2 Determinação da vida de prateleira da alface minimamente processada irradiada.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Avaliação microbiológica da alface disponível no comercio	31
4.2 Avaliação microbiológica durante o processamento da alface americana	36
4.3 Irradiação da alface.....	43
4.3.1 Determinação do valor D_{10} para <i>Salmonella</i>	45
4.3.2 Determinação do valor D_{10} para <i>E. coli</i> O157:H7	47
4.3.3 Efeito da radiação gama sobre os atributos sensoriais da alface americana minimamente processada	49
4.3.4 Dose de irradiação recomendada para alface americana.....	56
5 CONCLUSÕES	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de casos de enfermidades transmitidas por alimentos ocorridas nos Estados Unidos nos últimos 3 anos e envolvendo os 11 principais agentes.....	6
Tabela 2: Agentes bacterianos de alguns surtos de enfermidades transmitidas por vegetais.....	7
Tabela 3: Valores de D ₁₀ de irradiação para <i>Salmonella</i> em diferentes produtos.	13
Tabela 4: Valores de D ₁₀ de irradiação para <i>E. coli</i> O157:H7 em diferentes produtos.	13
Tabela 5: Critérios para análise sensorial de alface americana minimamente processada aplicando a técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ, segundo STONE et al. (1974).	28
Tabela 6: Avaliação microbiológica em 15 amostras de alface minimamente processada (folhas inteiras embaladas em atmosfera modificada e pronta para consumo) adquiridas no comércio da cidade de São Paulo (06 a 10/2002).....	32
Tabela 7: Avaliação microbiológica de 20 amostras de alface americana “in natura” (em cabeça) adquiridas no comércio da cidade de São Paulo (06 a 08/2002)	33
Tabela 8: Populações de microrganismos em alface americana minimamente processada, nas diferentes etapas – Processo industrial – Experimento 1 (89 mgCl/L)	37

Tabela 9: Populações de microrganismos em alface americana minimamente processada, nas diferentes etapas – Processo industrial – Experimento 2 (162 mgCl/L).	38
Tabela 10: Populações de microrganismos em alface americana minimamente processada, nas diferentes etapas – Processo industrial – Experimento 3 (171 mgCl/L)	39
Tabela 11: Análise sensorial utilizando a técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ para os atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose, após irradiação com três doses diferentes, além do controle.....	50
Tabela 12: Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ, dos atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Controle (não irradiada).	52
Tabela 13: Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ, dos atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Irradiada com dose de 0,7 kGy	52
Tabela 14: Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ, dos atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Irradiada com dose de 0,9 kGy	53
Tabela 15: Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ, dos atributos sensoriais	

da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Irradiada com 1,1 kGy.....	53
---	----

Tabela 16: Populações de microrganismos nas amostras dos estudos de vida de prateleira da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, para 3 doses de irradiação e do controle	55
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sobrevivência de <i>Salmonella</i> spp. inoculada artificialmente em alface americana minimamente processada, exposta a diferentes doses de radiação gama. A: experimento I; B: experimento II e C: experimento III	46
Figura 2: Sobrevivência de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada artificialmente em alface americana minimamente processada, exposta a diferentes doses de radiação gama. A: experimento I; B: experimento II e C: experimento III	48

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a viabilidade da aplicação da radiação gama (^{60}Co) em alface (*Lactuca sativa*, L) americana minimamente processada visando aumentar a segurança do consumidor. Foram estudados os níveis de contaminação da alface disponível no comércio (alface "in natura" e minimamente processada) da cidade de São Paulo, SP, a redução da população microbiana através do processamento mínimo, os valores de D_{10} de radiação gama para *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 inoculadas artificialmente e os efeitos da radiação sobre os atributos sensoriais da alface minimamente processada. A alface americana "in natura" (em cabeça), disponível no comércio, apresentou populações de microrganismos aeróbios mesófilos que variaram entre $1,2 \times 10^3$ e $4,1 \times 10^7$ UFC/g, enquanto a alface minimamente processada apresentou populações de microrganismos aeróbios mesófilos que variaram entre $4,3 \times 10^4$ e $9,2 \times 10^6$ UFC/g, com o predomínio de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. O processamento mínimo da alface reduziu as populações de coliformes e de microrganismos aeróbios em 0,9 e 2,7 ciclos logarítmicos, respectivamente. Os valores de D_{10} variaram de 0,16 a 0,23 kGy para *Salmonella* spp. e de 0,11 a 0,12 kGy para *E. coli* O157:H7. A exposição da alface à dose de 0,7 kGy não alterou os atributos sensoriais do produto o que ocorreu com a textura quando tratada com a dose de 1,1 kGy e com a dose de 0,9 kGy após 3 dias do tratamento. A vida de prateleira da alface minimamente processada, embalada em aerobiose, exposta à dose de 0,9 kGy e mantida a 5°C foi de 2 dias devido às alterações do atributo odor. O processamento mínimo da alface americana com solução clorada, embalagem em aerobiose e exposição à dose de radiação de 0,7 kGy permitiu a redução de 4 ciclos log para *Salmonella* spp. e de 6,8 ciclos log para *E. coli* O157:H7, sem alterar as características sensoriais do produto. O processamento mínimo da alface americana combinado com a irradiação será suficiente para garantir a segurança microbiológica dos consumidores se, desde o cultivo, as boas práticas de higiene forem atendidas.

ABSTRACT

The feasibility of gamma radiation (^{60}Co) in combination with minimal processing (MP) to reduce the number of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in iceberg lettuce (*Lactuca sativa*, L) (seccioned) was study in order to increase the safety of consumer. The levels of contamination of "in natura" and minimally processed iceberg lettuce in retail market in São Paulo city, SP, the reduction of the microbial population during the processing, the D_{10} values for *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in iceberg lettuce as well as the sensory evaluation of the irradiated product were evaluated. Iceberg lettuce (head) showed aerobic mesophilic microorganism populations varied from 1.2×10^3 to 4.1×10^7 CFU/g while in MP lettuce these populations varied from 4.3×10^4 to 9.2×10^6 CFU/g. with *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. predominating. The immersion in chlorine (200 ppm) reduced fecal coliform and aerobic mesophilic microorganisms by 0.9 and 2.7 log, respectively. D values varied from 0.16 to 0.23 kGy for *Salmonella* spp. and from 0.11 to 0.12 kGy for *E. coli* O157:H7. MP iceberg lettuce exposed to 0.9 kGy does not showed any change on sensory attributes. However, the texture of the vegetable was affected during the exposition to 1.1 kGy. The shelf-life of air packed MP iceberg lettuce exposed to 0.9 kGy and stored at 5°C was two days due to change in odor and texture. The exposition of MP iceberg lettuce to 0.7 kGy reduced the population of *Salmonella* spp in 4.0 log and *E. coli* in 6.8 log without impairing the sensory attributes. The combination of minimal process and gamma radiation to improve the safety of iceberg lettuce is feasible if good hygiene practice is followed since farm level.

1 INTRODUÇÃO

O comércio de vegetais minimamente processados tem aumentado de forma significativa nos últimos anos. Estes produtos são submetidos a um processamento mínimo que tem por objetivo tornar o produto pronto para o consumo, manter ao máximo suas características de frescor, atendendo, assim, à demanda do consumidor por produto mais conveniente, fresco e saudável (ALZAMORA *et al.*, 2000).

Em geral, os produtos minimamente processados são aqueles que foram submetidos a uma ou várias operações como seleção, lavagem, descascamento e/ou corte, sanificação ou tratamento térmico e embalagem. Porém, nenhuma dessas operações garante a esterilidade ou estabilidade do produto e, por esta razão, estes são freqüentemente mantidos sob refrigeração (ALZAMORA *et al.*, 2000; NGUYEN-the & CARLIN, 1994).

O aspecto saudável e fresco desses produtos pode, no entanto, ser apenas aparente quando a qualidade da matéria prima, as condições do processo e as condições de conservação, seja de forma isolada ou combinada, permitem a contaminação, a sobrevivência e/ou a multiplicação de microrganismos, inclusive dos patogênicos (ALZAMORA *et al.*, 2000; NGUYEN-the & CARLIN, 1994).

A estabilidade dos vegetais minimamente processados depende principalmente da sua própria natureza, do processo utilizado e da sua forma de apresentação, ou seja, produtos inteiros, cortados ou picados. Neste último caso, o rompimento dos tecidos favorece a deterioração tanto de natureza química como microbiológica (ALZAMORA *et al.*, 2000; NGUYEN-the & CARLIN, 1994). GARG *et al.* (1990) e KING *et al.* (1991) relatam populações de microrganismos de 10^4 a 10^7 UFC/g em vegetais minimamente processados e prontos para o consumo.

Para os vegetais frescos em geral, a contaminação por microrganismos patogênicos pode ocorrer em diferentes fases, desde a sua produção até o consumo. Na fase de produção agrícola, a contaminação pode ter origem no solo contaminado, na água de irrigação contaminada, no adubo orgânico, nos excrementos de animais (domésticos ou silvestres), entre outros. Na colheita e no processamento, a contaminação pode ocorrer de forma cruzada com os operadores, contêineres, equipamentos e durante o transporte. Já na fase de comercialização, os microrganismos presentes no vegetal embalado podem multiplicar-se e, dependendo do tempo e da temperatura de conservação, podem atingir níveis que comprometem a qualidade do produto e/ou a saúde do consumidor (BEUCHAT, 1996; MARTÍNES *et al.*, 2000; NGUYEN-the & CARLIN, 1994).

No caso da alface, as etapas do processamento que contribuem para o controle microbiológico são: seleção, eliminação das folhas externas e partes danificadas, pré-lavagem para remover as sujidades e terra aderidas às folhas, lavagem, sanificação, centrifugação, embalagem (em alguns casos em atmosfera modificada ou a vácuo) e refrigeração (NGUYEN-the & CARLIN, 1994).

A etapa de lavagem, além de atuar na redução da carga microbiana, tem efeito importante na remoção dos fluidos dos tecidos liberados quando do corte dos vegetais. Na alface, ocorre liberação de fluidos celulares, incluindo várias enzimas como a polifenol oxidase, a catalase e a peroxidase que provocam rápido escurecimento (BOLIN *et al.*, 1977; KING *et al.*, 1991). O excesso de água na superfície das folhas é considerado um dos principais fatores na redução da sua estabilidade e, para minimizá-lo, utiliza-se, entre outros métodos, a centrifugação. Essa técnica, no entanto, quando aplicada em excesso, pode causar a desidratação do vegetal. O corte do vegetal também tem influência na estabilidade do produto. Quando cortado em pedaços pequenos, a estabilidade pode ser menor do que se for cortado em pedaços maiores (BOLIN & HUXSOLL, 1991; BOLIN *et al.*, 1977).

Com a função de reduzir a carga microbiana dos vegetais minimamente processados, a etapa de sanificação com solução clorada é, na atualidade, o principal recurso para a redução dos microrganismos patogênicos para níveis seguros, podendo ser aplicada nos vegetais íntegros ou cortados (BEUCHAT, 1992; BEUCHAT, 2000; NGUYEN-the & CARLIN, 1994).

A sanificação com solução clorada reduz a carga de microrganismos de 1 a 2 escalas logarítmicas, podendo chegar até 4 escalas logarítmicas (BEUCHAT, 2000; NGUYEN-the & CARLIN, 1994). A baixa eficiência é devido a fatores como a rugosidade e dobras do vegetal que dificultam a ação mecânica da lavagem, a baixa penetração dos sanificantes (BEUCHAT, 2000; THAYER & RAJKOWSKI, 1999) e a rápida inativação do cloro pela matéria orgânica (BEUCHAT, 1992; BEUCHAT, 2000). Outro fator importante é a camada de cera produzida pelo próprio vegetal, que recobre os microrganismos presentes na sua superfície, reduzindo o efeito da ação mecânica da lavagem e impedindo a ação do sanificante. Neste caso, os sanificantes com ação tensoativa ou associados a substâncias tensoativas podem ser mais eficientes. No entanto, também podem afetar as características sensoriais do produto, o que requer cuidados para sua aplicação (BEUCHAT, 2000).

A deterioração da alface é evidenciada pela perda da sua cor característica e do intumescimento e escurecimento nas áreas do corte. O escurecimento pode ser resultado de reações enzimáticas a partir dos fluidos liberados pelos cortes do tecido. Neste caso, os principais fatores que favorecem a conservação da alface cortada são dano físico mínimo, arraste dos fluidos liberados, pouca umidade na superfície e baixa temperatura. Este último reduz a velocidade das reações químicas e a ação dos microrganismos (BOLIN & HUXSOLL, 1991; KING *et al.*, 1991). BOLIN *et al.* (1977) verificaram que a estocagem de alface americana picada e embalada em saco de polietileno, em temperatura de 2°C aumentou em 2,5 vezes o tempo de conservação, quando comparada com a temperatura de 10°C. BOLIN &

HUXSOLL (1991) e KING *et al.* (1991) observaram que a temperatura de 1,1°C fornece melhores condições para manutenção da qualidade da alface minimamente processada.

A estabilidade também pode ser melhorada através da modificação da atmosfera, com a diminuição da concentração de O₂ e aumento da concentração de CO₂ (HAMZA *et al.*, 1996; NGUYEN-the & CARLIN, 1994; PRAKASH *et al.*, 2000). O estudo realizado por KING *et al.* (1991) indicou que o uso da embalagem selada retarda significativamente a perda das características visuais do produto, quando comparada com a embalagem não selada. Quanto ao emprego da atmosfera modificada, segundo BALLANTYNE & SELMAN (1988), a melhor combinação de gases é de 1-3% de O₂ e de 5-6% de CO₂.

Outros estudos demonstraram que o uso de produtos químicos como cloro, dióxido de enxofre, fosfato de cálcio, fosfato de sódio, fosfato dibásico de sódio, pirofosfato tribásico de sódio, bissulfito e sorbato de potássio não representaram vantagens para o controle da deterioração química (BOLIN *et al.*, 1977; PRIEPKE *et al.*, 1976).

Além da perda da qualidade causada pela desidratação dos tecidos e pelas reações químicas e enzimáticas responsáveis pelo escurecimento dos vegetais, a deterioração pela ação microbiana tem papel relevante. Esta deterioração é causada pela ação de microrganismos remanescentes do processamento que se manifestam seletivamente em função das condições do produto e do seu armazenamento, ou seja, são favorecidos os microrganismos psicotróficos. Quando o produto é embalado sob atmosfera modificada, há também o favorecimento dos microrganismos anaeróbios (NGUYEN-the & CARLIN, 1994). Dentre os deteriorantes observados em vegetais minimamente processados e prontos para o consumo, os que predominam são *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas (GARCÍA-GIMENO & ZURERA-COSANO, 1997).

BOLIN *et al.* (1977) verificaram um aumento de 5 ciclos logarítmicos, após 18 dias a 5°C na população inicial de 10^3 UFC/g de alface americana picada e embalada em saco de polietileno, e de 3 ciclos logarítmicos, após 11 dias, na população inicial de 10^6 UFC/g no mesmo produto, armazenado nas mesmas condições. Estes dados são compatíveis com os apresentados por GARCÍA-GIMENO & ZURERA-COSANO (1997) que avaliaram a vida de prateleira de vegetais minimamente processados a 5°C, 10°C e 15°C. As populações iniciais de bactérias lácticas foram de aproximadamente 10^3 UFC/g e atingiram níveis de 10^6 em 8 dias, 84 h e 60 h, quando mantidos a 5°C, 10°C e 15°C, respectivamente. Populações iniciais de bactérias psicrótroficas de aproximadamente 10^5 UFC/g atingiram níveis de 10^7 em 8 dias, 48 h e 36 h quando mantidos a 5°C, 10°C e 15°C, respectivamente.

As condições que permitem a sobrevivência e proliferação dos deteriorantes podem, da mesma forma, permitir a sobrevivência e/ou a proliferação de alguns microrganismos patogênicos. Os microrganismos patogênicos mais freqüentemente encontrados em vegetais crus são: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Cyclosporum*, *Cryptosporidium*, *Escherichia coli* O157H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia enterocolitica* (NGUYEN-the & CARLIN, 1994; BEUCHAT, 1996; TAUXE *et al.*, 1997; THAYER & RAJKOWSKI, 1999).

Dentre os microrganismos patogênicos descritos acima, os mais envolvidos com enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs) são *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* e *E. coli* O157:H7, conforme os dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Número de casos de enfermidades transmitidas por alimentos ocorridas nos Estados Unidos nos últimos 3 anos envolvendo os 11 principais agentes (CDC, 2000b; CDC, 2001; CDC, 2002b).

Agente	Número de casos de doenças			
	1999	2000	2001	Total (%)
<i>Salmonella</i>	4.488	4.330	5.198	14.016 (37,5)
<i>Campylobacter</i>	3.884	4.713	4.740	13.337 (35,7)
<i>Shigella</i>	1.040	2355	2.201	5.596 (15,0)
<i>E. coli</i> O157:H7	510	626	565	1.701 (4,6)
<i>Cryptosporidium</i> ¹	457	535	574	1.566 (4,2)
<i>Yersinia</i>	163	133	145	441 (1,2)
<i>Listeria</i>	114	105	94	313 (0,8)
<i>Vibrio</i>	48	54	80	182 (0,5)
HUS ²	-	-	76	76 (0,2)
<i>Cyclospora</i> ¹	12	22	32	66 (0,2)
Outras <i>E. coli</i>	-	57	-	57 (0,1)
Total	10.716	12.930	13.705	37.351 (100)

¹: protozoários

²: síndrome urêmica hemolítica - registrado a partir de 2001

Considerando somente os vegetais, a proporção de casos em relação ao agente altera de forma significativa a Tabela 1, principalmente porque muitos microrganismos têm relação estreita com o produto. Na Tabela 2, são apresentados alguns casos de surtos envolvendo bactérias patogênicas veiculadas por vegetais.

Tabela 2: Agentes bacterianos de alguns surtos de enfermidades transmitidas por vegetais.

Microrganismo	Produto envolvido	Ano da ocorrência	Referência
<i>Bacillus cereus</i>	Brotos de vegetais	-	PORTNOY <i>et al.</i> , 1976
<i>Listeria monocytogenes</i>	Salada "cole slaw"	1981	SCHLECH <i>et al.</i> 1983
<i>Vibrio cholerae</i>	Leite de coco cong.	1991	TAYLOR <i>et al.</i> , 1993
<i>Salmonella</i>	Tomate	1990	CSPI, 1999
		1993	CSPI, 1999
		1999	WEISSINGER <i>et al.</i> , 2000
	Brotos: alfafa	-	MAHON <i>et al.</i> , 1996 ²
	feijão	1988	O'MAHONY <i>et al.</i> , 1990
	alfafa	1996	VAN BENEDEN <i>et al.</i> , 1996 ²
	alfafa	1995	CSPI, 1999
	alfafa	1995/1996	CSPI, 1999
	alfafa	1996	CSPI, 1999
	alfafa	1997	CSPI, 1999
	alfafa	1997	CSPI, 1999
	alfafa	1998	CSPI, 1999
	alfafa	1998/1999	CSPI, 1999
	alfafa	-	STRATTON <i>et al.</i> , 2001
	feijão	2000	HONISH & NGUYEN, 2001
	feijão	2000	VAN DUYNHOVEN <i>et al.</i> , 2002
	alfafa	2002	CDC, 2002a
	Melão	1991	BLOSTEIN <i>et al.</i> , 1991
		1979	CDC, 1979 ²
	Cantaloupe	1997	MOHLE-BOETANI <i>et al.</i> , 1999
		1991	CSPI, 1999
	Suco de maçã	1975	CDC, 1975 ²
	Suco de laranja	1995	COOK <i>et al.</i> , 1996 ²
		1999	CDC, 1999
	Cebola	-	COOK <i>et al.</i> , 1995 ²
	Frutas e vegetais	1996	OOI <i>et al.</i> , 1997

²: citados por TAUXE *et al.*, 1997.

Continua

Tabela 2: Agentes bacterianos de alguns surtos de enfermidades transmitidas por vegetais (continuação).

Microrganismo	Produto envolvido	Ano da ocorrência	Referência
<i>Eschereichia coli</i> O157:H7	Cenoura Suco de maçã	1994	CDC, 1994 ²
		1991	BESSER <i>et al.</i> , 1993
		1996	CDC, 1996b
		1996	CSPI, 1999
		1996	CSPI, 1999
	Alface	1995	ACKERS <i>et al.</i> , 1998
		-	MERMIN <i>et al.</i> , 1996 ²
		1995	CSPI, 1999
		1995	CSPI, 1999
		1995	CSPI, 1999
		1996	CSPI, 1999
		1996	HILBORN <i>et al.</i> , 1999
		1999	CSPI, 1999
	Alface e cenoura	1993	CDC, 1993
	Vegetais	1992	CSPI, 1999
	Salada	1993	CSPI, 1999
		1998	CSPI, 1999
	Cantaloupe	1993	CSPI, 1999
	Brotos: rabanete rabanete alfafa alfafa	1996	WATANABE <i>et al.</i> , 1999
		1996	MICHINO <i>et al.</i> , 1999
		1997	CDC, 1997
		1998	CSPI, 1999
	Salada Cole slaw	1998	CSPI, 1999
	Salada de frutas	1993	CSPI, 1999
		1998	CSPI, 1999
<i>Shigella</i>	Alface	1994	KAPPERUD <i>et al.</i> 1995
		-	FROST <i>et al.</i> 1995
		1996	DAVIS <i>et al.</i> , 1988
		-	MARTIN <i>et al.</i> 1986
	Salada de vegetais	1992	DUNN <i>et al.</i> , 1995
	Alho-porró	1994	CSPI, 1999
	Salsinha	1998	CSPI, 1999

²: citados por TAUXE *et al.*, 1997.

Segundo os dados da Tabela 2, os microrganismos prevalentes são *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 e *Shigella* e os vegetais mais envolvidos são os brotos em geral e alface.

Salmonella é um dos microrganismos mais freqüentemente incriminados em surtos de ETAs em diferentes países e envolvendo os mais variados tipos de produtos. As doenças causadas por *Salmonella* podem ser classificadas em três grupos: febre tifóide, causada pela *Salmonella* Typhi, as febres entéricas causadas por *Salmonella* Paratyphi (A, B e C) e as salmoneloses causadas pelas demais salmonelas. A salmonelose é uma enterocolite que inclui diarreia, febre, dores abdominais e vômitos (FRANCO & LANDGRAF, 1996; ICMSF, 1996). A dose infectante depende do indivíduo, da espécie e sorogrupo do microrganismo e do produto que veicula *Salmonella*. As menores doses necessárias para causar salmonelose estão relacionados com produtos gordurosos onde 50 células foram suficientes para desencadear o processo (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O reservatório natural de *Salmonella* é o trato intestinal do homem e de animais, onde as aves têm papel relevante. Está amplamente distribuída na natureza e é transmitida para o homem, principalmente, através de alimentos e água (FRANCO & LANDGRAF, 1996; ICMSF, 1996; LEITÃO, 1988; LEITÃO, 1979).

E. coli O157:H7 causa no homem desde uma simples diarreia até síndromes mais complicadas como a colite hemorrágica (diarreia aguda seguida de diarreia sanguinolenta e ausência de febre), podendo evoluir para a síndrome da uremia hemolítica (HUS) ou síndrome trombótica trombocitopênica (DOYLE *et al.*, 2001). A dose infecciosa ainda não está claramente definida e, segundo alguns pesquisadores são necessárias 50 UFC/g para iniciar a doença (WELLS *et al.*, 1983; JOHNSON *et al.*, 1995) enquanto para outros, a dose pode ser de 1 a 4 células/g (DUNCAN & HACKNEY, 1994).

O principal reservatório natural de *E. coli* O157:H7 é o trato intestinal do gado bovino. É transmitida para os humanos principalmente através de alimentos e água. A contaminação de vegetais minimamente processados pode ocorrer na plantação, na colheita e no transporte por contaminação direta com fezes de animais infectados, adubos orgânicos contaminados ou indiretamente através da água contaminada. No processamento, a contaminação ocorre de forma cruzada com equipamentos inadequadamente sanitizados, água contaminada, operador e também quando o fluxo do processo é cruzado, ou seja, quando o produto limpo cruza com o produto sujo (BEUCHAT, 1996).

Em 1982, foi descrito o primeiro surto de ETA causado por *E. coli* O157:H7, veiculada por hambúrguer e envolveu 47 pessoas nos Estados Unidos (RILEY et al., 1983). A partir de então, vários casos foram registrados em diferentes países, envolvendo diferentes produtos, tais como os cárneos, que são os mais frequentes, lácteos, entre outros (BELONGIA et al., 1991; CDC, 2000a; CSPI, 1999; DUNCAN et al., 1994; MORGAN et al., 1993; ProMED, 2002; TARR, 1993; WILLSHAW et al., 1994). Também foram detectados vários surtos envolvendo água (RICE et al., 1992; ISAÄCSON et al., 1993; KEENE et al., 1994; CDC, 1996a), além daqueles que envolveram os vegetais já apresentados na Tabela 2.

O grande número de surtos envolvendo brotos de vegetais gerou diversos estudos que concluíram que o tratamento com soluções de desinfetante não é suficiente para a total destruição de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 pois esses microrganismos se multiplicam durante o cultivo dos brotos (JAQUETT et al., 1996; TAORMINA & BEUCHAT, 1999; BEUCHART et al. 2001).

Para alface, vegetal envolvido em vários surtos, a contaminação pode ocorrer durante o cultivo uma vez que *E. coli* O157:H7 adere na superfície do vegetal e migra para os tecidos através da raiz e/ou fissuras (SOLOMON et al.,

2002a; SOLOMON *et al.*, 2002b; TAKEUCHI & FRANK, 2001a; TAKEUCHI & FRANK, 2001b).

Em razão da gravidade de alguns surtos envolvendo vegetais, das dificuldades para a eliminação destes microrganismos de vegetais crus e do grande crescimento do mercado de vegetais minimamente processados, alguns estudos têm recomendado a irradiação em combinação com o processo de higiene e sanificação para aumentar a segurança microbiológica e o tempo de vida de prateleira. Nestes casos, as doses aplicadas devem ser baixas para não afetar as características sensoriais do produto (FARKAS, 1989; THAYER & RAJKOWSKI, 1999).

A irradiação como processo de controle de microrganismos tem sua eficiência comprovada em diferentes ramos da indústria alimentícia, com benefícios diretos na extensão da vida de prateleira, redução da aplicação de produtos químicos e conservadores e redução da carga microbiana (FARKAS, 1998; RADOMYSKI, 1994).

A irradiação de frutas e vegetais é bastante difundida e aplicada com o objetivo de controlar o amadurecimento, a população de fitopatógenos na pós-colheita e promover a desinfestação, sem o enfoque no controle de patógenos para o homem. Porém, em razão de surtos de ETA associados a vegetais frescos, alguns estudos estão sendo conduzidos para testar o uso dessa tecnologia na eliminação de patógenos destes produtos, uma vez que já foi demonstrado que os processos tradicionais de desinfecção química não garantem a segurança microbiológica desses alimentos (THAYER & RAJKOWSKI, 1999).

Em pesquisa realizada com cenoura cortada, a aplicação de 2 kGy inibiu o crescimento da microbiota e as amostras foram as preferidas em testes sensoriais, em comparação com o processo de lavagem com solução clorada seguida de centrifugação (CHERVIN & BOISSEAU, 1994). Outro estudo com cenoura, comparando o tratamento com solução clorada com o emprego de

irradiação (0,5 kGy) associado ao uso de atmosfera de CO₂, mostrou que após 9 dias a 2°C, o vegetal irradiado manteve a população microbiana em 1,3x10³ UFC/g enquanto pelo processo tradicional, a contagem foi de 8,7x10⁴ UFC/g (HAGENMAIER & BAKER, 1998).

No processamento de alface americana, cortada e embalada em atmosfera modificada, a irradiação combinada com a lavagem com solução clorada tem demonstrado eficiência no controle da microbiota e aumento da vida de prateleira, como apresentado por HAGENMAIER & BAKER (1997). Segundo esses autores, a exposição da alface americana cortada à dose de 0,19 kGy manteve a população microbiana em 2,6x10² UFC/g, após 8 dias a 2±2°C, enquanto a não tratada apresentou população de 2,2x10⁵ UFC/g.

PRAKASH *et al.* (2000) avaliaram o efeito do uso de atmosfera modificada (1,5% de O₂ e 4% de CO₂) com a irradiação (0,35 kGy) em alface romana cortada e concluíram que ocorre redução de 1,5 ciclos logarítmicos na população bacteriana. Após o tratamento, a alface foi mantida a 4°C por 21 dias. Nestas condições, a determinação da textura mostrou redução de 10% quando comparada ao controle, enquanto pela análise sensorial (cor, textura e "off-flavor") não foram observadas diferenças entre o produto irradiado e o controle, no período de 14 dias.

A radiosensibilidade de um microrganismo é determinada pelo valor D₁₀, que é a dose necessária para redução de 90% ou de 1 ciclo logarítmico da população microbiana. Essa dose depende de vários fatores, entre eles o produto em que foi determinado. Nas Tabelas 3 e 4 encontram-se alguns valores de D₁₀ para *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7, respectivamente.

Segundo a "NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS", dos Estados Unidos, é preciso que o processamento de vegetais, em geral, reduza em 5 ciclos logarítmicos a população microbiana de acordo estudo conduzido para sementes de alfafa.

Tabela 3: Valores de D₁₀ de radiação para *Salmonella* em diferentes produtos.

Produto	D ₁₀ (kGy)*	Referências
Carne bovina	0,37 a 0,78	FARKAS, 1998
Carne bovina congelada	0,56 a 0,96	FARKAS, 1998; RADOMYSKI <i>et al.</i> , 1994
Carde suína	0,40 a 0,92	FARKAS, 1998
Carne de frango	0,18 a 0,79	FARKAS, 1998; RADOMYSKI <i>et al.</i> , 1994; SANTOS, 1997
Carne de frango cong.	0,45 a 1,29	FARKAS, 1998; RADOMYSKI <i>et al.</i> , 1994
Ovo	0,10 a 0,77	FARKAS, 1998; RADOMYSKI <i>et al.</i> , 1994
Camarão resfriado	0,3 a 0,5	FARKAS, 1998
Camarão congelado	0,4 a 0,6	FARKAS, 1998
Couve-flor cozida	0,59	FARKAS, 1998
Batata cozida	0,46	FARKAS, 1998
Broto de rabanete	0,46 a 0,54	RAJKOWSKI & THAYER, 2000
Brotos de vegetais	0,46	RAJKWOSKI & THAYER, 2000

* os valores apresentados variam em função da espécie, da temperatura durante a irradiação, do teor de gordura, atmosfera e da forma de apresentação do produto.

Tabela 4: Valores de D₁₀ de radiação para *E. coli* O157:H7 em diferentes produtos.

Produto	D ₁₀ (kGy)*	Referências
Frango	0,26 a 0,42	FARKAS, 1998; RADOMYSKI <i>et al.</i> , 1994 THAYER & BOYD, 1993
Hamburguer	0,17 a 0,27	CHIRINOS, 2002
Carne bovina moída	0,24	FARKAS, 1998
Carne bov. moída cong.	0,31 a 0,39	FARKAS, 1998
Suco de maçã	0,12 a 0,35	BUCHANAN <i>et al.</i> , 1998
Alface	0,12 a 0,14	NIEMIRA, 2002
Broto de alfafa	0,27	RAJKOWSKI & THAYER, 2000
Broto de brocoli	0,26	RAJKOWSKI & THAYER, 2000
Broto de rabanete	0,30 a 0,34	RAJKOWSKI & THAYER, 2000

* os valores apresentados variam em função, da temperatura durante a irradiação, do teor de gordura, atmosfera e da forma de apresentação do produto.

2 OBJETIVOS

Verificar a redução da contaminação microbiana na alface americana (*Lactuca sativa*, L.) através do seu processamento em nível industrial.

Determinar qual a dose de radiação gama em combinação com o processamento mínimo de alface americana para reduzir em 5 escalas logarítmicas as populações de *Salmonella* spp. e de *Escherichia coli* O157:H7.

Determinar a dose de tolerância e a vida de prateleira da alface americana minimamente processada e irradiada, através da análise sensorial, visando a aceitação pelo consumidor e a sua segurança.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Microrganismos

E. coli O157:H7 – EDL933 (RILEY et al., 1983), isolada de hambúrguer de carne bovina, foi gentilmente cedida pela Dra. Tânia Gomes da Universidade Federal de São Paulo.

E. coli O157:H7 C7927 e *E. coli* O157:H7 E0019 – foram cedidas pelo Dr. M. P. Doyle, da Universidade da Geórgia, Estados Unidos. A primeira isolada de paciente com sintomatologia característica da infecção causada por *E. coli* O157:H7 e a segunda isolada de “swab” retal bovino.

Salmonella Infantis e *Salmonella* Enteritidis foram cedidas pela Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo.

Salmonella Typhimurium – ATCC 14028

Estas cepas foram utilizadas nos experimentos para determinar os valores de D₁₀, conforme descrito no item 3.2.3. Todas as cepas foram mantidas a –70°C até a utilização.

3.1.2 Alface

3.1.2.1 Avaliação microbiológica da alface americana disponível no comércio

Foram adquiridas 20 amostras de alface americana “in natura” (em cabeça) (*Lactuca sativa*, L.) para a avaliação microbiológica da alface

disponível no comércio, através da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e de *Enterobacteriaceae*.

Foram adquiridas 15 amostras de alface americana (em folha) minimamente processada embalada em atmosfera modificada para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *Enterobacteriaceae* e de *Pseudomonas* spp., e determinação do número mais provável de coliformes totais (NMP), de coliformes fecais e de *E. coli*, além da pesquisa de *Salmonella* spp. e de *E. coli* O157:H7.

As amostras foram adquiridas, de maneira aleatória, no comércio da cidade de São Paulo, SP, no período de junho a novembro de 2002.

3.1.2.2 Avaliação microbiológica durante o processamento mínimo da alface

As amostras foram coletadas em uma indústria de processamento de vegetais, localizada em Taboão da Serra, SP. A redução da contaminação microbiológica foi avaliada em 3 etapas do processamento mínimo da alface, colhidas e processadas no mesmo dia da avaliação.

Etapa 1 - Seleção da alface: consiste na eliminação das sujidades visíveis, eliminação das folhas danificadas e eliminação do talo, logo após ter sido recebida. Nesta etapa, a alface está na forma de cabeça.

Etapa 2 - Alface lavada e picada: após ter sido lavada com solução detergente resfriada e picada.

Etapa 3 - Alface minimamente processada: após ter sido sanificada com solução clorada refrigerada, centrifugada e embalada.

A temperatura durante o processamento foi de aproximadamente 10°C.

De cada etapa foram coletadas 5 amostras. O experimento foi repetido outras duas vezes, em dias diferentes, com amostras provenientes de diferentes fornecedores de matéria-prima. As análises microbiológicas realizadas foram: contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, e de *Pseudomonas* spp., e a determinação do número mais provável de coliformes totais, de coliformes fecais e de *E. coli*, além da pesquisa de *Salmonella* spp. e de *E. coli* O157:H7.

3.1.2.3 Determinação do valor D_{10} de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 em alface minimamente processada refrigerada

Para a determinação do valor D_{10} de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 em alface minimamente processada refrigerada, foram adquiridas 10 cabeças de alface americana para cada experimento. Foram realizados 3 experimentos com amostras adquiridas de 3 locais comerciais da cidade de São Paulo, SP, em 3 períodos diferentes entre abril e junho de 2002. Foram utilizadas alfaces com aproximadamente 24 h pós-colheita.

3.1.2.4 Determinação da dose de irradiação máxima aceitável e determinação da vida de prateleira do produto irradiado

Para a determinação da dose de irradiação máxima aceitável pela alface americana (produto picado) minimamente processada e para a determinação da sua vida de prateleira foram adquiridos 50 pacotes de alface americana minimamente processada (picada), embalada em saco plástico com 500g cada e em aerobiose. As amostras, adquiridas de uma indústria de processamento de vegetais, localizada em Taboão da Serra, SP, foram colhidas, processadas e testadas no mesmo dia.

3.1.3 Fonte radioativa

Canal experimental da Embrarad S.A., localizada em Cotia, SP. Irradiador Gamma Beam JS-7500 (Nordion International Inc. Kanata, Ontário, Canadá), que utiliza uma fonte de ^{60}Co .

A taxa de dose da fonte era de 2,2 kGy/hora.

As doses reais foram determinadas através de dosímetro “redperspek Harwell” (Londres, UK) e a incerteza foi de 3%.

3.2 Métodos

3.2.1 Análises microbiológicas

3.2.1.1 Preparo da diluição decimal seriada (SWANSON *et al.*, 2001)

As amostras de alface minimamente processadas em folha e as “in natura” (em cabeça) foram picadas e misturadas.

Porções de 10g da amostra picada foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada 0,1% por 1 minuto em “stomacher” (Stomacher 400, Seward, London, UK) e, a partir desta suspensão, foram preparadas diluições decimais seriadas com água peptonada 0,1%.

3.2.1.2 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (MORTON, 2001)

De cada diluição preparada foi transferido 1 mL para placa de Petri, sobre a qual foi adicionado ágar para contagem padrão (Merck, Darmstadt,

Alemanha), previamente fundido e resfriado a 45–46°C. Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas em posição invertida a 35–37°C por 48 h. Após a incubação, foram contadas as placas com 25 a 250 colônias e aplicados os respectivos fatores de correção das diluições. Os resultados foram expressos em UFC/g.

3.2.1.3 Contagem de microrganismos psicrotróficos (COUSIN *et al.*, 2001)

De cada diluição preparada foi transferido 0,1 mL sobre uma placa de Petri contendo ágar para contagem padrão (Merck) e espalhado com auxílio de um bastão em “L”. Após a absorção completa da amostra pelo ágar, as placas foram incubadas em posição invertida a 6–8°C por 10 dias. Após a incubação, foram contadas as placas com 15 a 150 colônias e aplicados os respectivos fatores de correção das diluições. Os resultados foram expressos em UFC/g.

3.2.1.4 Contagem de *Enterobacteriaceae* (KORNACKI & JOHNSON, 2001)

De cada diluição preparada foi transferido 1 mL para placa de Petri, sobre a qual foi adicionado ágar VRBG (Oxoid, Basingstoke, UK), previamente fundido e resfriado a 45–46°C. Após a homogeneização e solidificação do ágar, foi adicionado uma porção do mesmo ágar para formar uma sobre-camada. Após a solidificação, as placas foram incubadas, em posição invertida, a 35–37°C por 24 h. Após a incubação, foram contadas as colônias características (coloração vermelho-púrpura) das placas com 15 a 150 colônias e aplicados os respectivos fatores de correção das diluições. Os resultados foram expressos em UFC/g.

3.2.1.5 Contagem de *Pseudomonas* spp. (UNITED STATES, 1999)

De cada diluição preparada foi transferido 0,1 mL sobre uma placa de Petri contendo ágar Cetrimide (Difco, Detroit, USA) e espalhado com auxílio de um bastão em "L". Após a absorção completa da amostra pelo ágar, as placas foram incubadas em posição invertida a 35-37°C por 24–48h. Após a incubação, foram contadas as colônias características (irregulares, achatadas e com coloração esverdeada) das placas com 15 a 150 colônias e aplicados os respectivos fatores de correção das diluições. Os resultados foram expressos em UFC/g.

3.2.1.6 Determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e fecais (KORNACKI & JOHNSON, 2001)

De cada diluição preparada foram transferidos 3 mL para três tubos contendo caldo lactosado lauril sulfato de sódio (Merck) e incubados a 35 - 37°C por 24–48h. Após a incubação, cada tubo que apresentou turvação e produção de gás foi inoculado em dois tubos, um contendo caldo lactosado com bile e verde brilhante (Merck) e outro contendo caldo EC (Difco). Os tubos contendo caldo lactosado com bile e verde brilhante foram incubados a 35 – 37°C por 24–48 h e corresponderam à confirmação para coliforme total. Os tubos contendo caldo EC foram incubados a 44,8–45,2°C por 24 – 48 h e corresponderam à confirmação para coliforme fecal. A partir dos tubos que apresentaram turvação e produção de gás foram calculados os respectivos números mais prováveis por grama (NMP/g), utilizando a tabela de NMP para 3 séries de 3 tubos conforme SWANSON *et al.* (2001). Os resultados foram expressos como NMP/g.

3.2.1.7 Determinação do Número Mais Provável de *E. coli* (KORNACKI & JOHNSON, 2001)

Os tubos contendo caldo EC que apresentaram turvação e produção de gás na prova de coliformes fecais (item 3.2.1.6) foram semeados em placas contendo ágar EMB-Levine (Difco) e incubadas a 35 - 37°C por 24h. As colônias suspeitas (escuras, com centro negro e com ou sem brilho verde metálico) foram confirmadas pela série bioquímica IMViC (produção de indol, teste de vermelho de metila, teste de Voges-Proskauer e utilização do carbono a partir de citrato). A partir dos tubos positivos para *E. coli*, foram calculados os respectivos NMP/g, utilizando a tabela de NMP para 3 séries de 3 tubos conforme SWANSON *et al.* (2001). Os resultados foram expressos como NMP/g.

3.2.1.8 Pesquisa de *Salmonella* spp. (ANDREWS *et al.*, 2001, modificado)

Porção de 25g foi inoculada em 225 mL de água peptonada tamponada (Biobras, Montes Claros, BR) e incubado a 35-37°C por 20-24h. Após a incubação foi transferido 0,1 mL para caldo Rappaport (Biobras) e incubado a 41-43°C por 20-24h. Após a incubação foi repicado em ágar MLCB (Oxoid) e ágar verde brilhante (Biobras) e incubados 35-37°C por 24h. De 2 a 4 colônias suspeitas, foram isoladas e confirmadas pelas provas bioquímica em ágar Kliger ferro (Difco), caldo lisina (Difco) e caldo uréia (Oxoid), API 20E (bioMérieux) e sorologia com soros polivalentes "O" e "H" (Difco).

3.2.1.9 Pesquisa de *E. coli* O157:H7 (MENG *et al.*, 2001)

Porção de 25g foi inoculada em 225 mL de caldo EC (Difco) com novobiocina e incubado a 35-37°C por 24h. Após a incubação, uma alíquota foi

semeada em placa de Petri contendo ágar MacConkey Sorbitol (Difco) e incubada a 35-37°C por 24h. De 2 a 4 colônias suspeitas (sorbitol negativas) foram semeadas em ágar nutriente para confirmação bioquímica empregando ágar TSI (Difco), caldo lactosado com bile, verde brilhante e MUG – Fluorocult (Merck), API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e sorologia – soro *E. coli* O157 (Difco) e soro *E. coli* H7 anti H7 (Difco).

3.2.2 Método para a quantificação do cloro livre (FRANSON, 1998)

Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL de solução tampão fosfato (fosfato dissódico, fosfato monopotássico e EDTA – Merck), 0,5 mL de solução DPD (N,N dietilparafenilenodiamina, ácido sulfúrico, EDTA - Merck) e 10 mL da amostra a ser testada, previamente diluída 1:100. Após homogeneização, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 515 nm (Micronal Mod. B342 II, São Paulo, BR). A absorbância obtida foi convertida em mg de cloro livre por litro a partir da equação da reta de uma curva padrão preparada com permanganato de potássio (Merck) e aplicando o fator de diluição da amostra.

3.2.3 Determinação do valor D_{10} para *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 em alface americana

Foram realizados 3 experimentos independentes, com amostras de alface obtidas em 3 locais diferentes e com as culturas microbianas preparadas especificamente para cada experimento.

3.2.3.1 Ativação das culturas microbianas

Para ativação das culturas, as cepas foram descongeladas, inoculadas em caldo tripticase soja (TSB - Merck) e incubadas a 35-37°C por 24h. Após este período, foram semeadas em ágar tripticase soja (TSA - Oxoid) e incubadas a 35-37°C por 24h e, após a incubação, foram mantidas sob refrigeração. Para o uso, as cepas foram testadas quanto à pureza e a viabilidade em ágar TSA e através de provas bioquímicas e sorológicas.

As cepas de *Salmonella* foram checadas quanto às características morfológicas em ágar MLCB (Oxoid) e ágar verde brilhante (VB - Biobras) e as provas bioquímicas foram as descritas no item 3.2.1.8.

As cepas de *E. coli* O157:H7 foram checadas quanto às características morfológicas em ágar EMB-Levine (Difco) e ágar MacConkey Sorbitol (Difco) e as provas bioquímicas foram as descritas no item 3.2.1.9.

3.2.3.2 Preparo em laboratório da alface minimamente processada

Corte: para cada experimento, foram utilizadas 10 cabeças de alface, a partir das quais foram removidas as folhas externas danificadas. As amostras foram cortadas de forma que os maiores pedaços apresentassem 2 x 5 cm. Após o corte, foram manualmente misturados até que todos as partes estivessem soltas.

Higienização: aproximadamente 900g de alface picada foram colocadas na peneira de uma centrífuga doméstica (Salad Spin Dryer, Co.Lim, China), onde foram enxaguadas com água corrente (potável e com 0,3 a 0,45 mg de Cl/L). Após o enxágüe, foram centrifugadas 10 vezes para eliminar o excesso de água e a amostra imersa em solução de hipoclorito de sódio (200 mg de cloro livre por litro) por 15 minutos. Em seguida, foram enxaguadas com água

corrente duas vezes, intercaladas por centrifugações (10 vezes) e finalmente imersas em água potável, previamente fervida e resfriada. Este último enxágüe teve por finalidade eliminar o excesso de cloro residual na superfície do vegetal e manter a alface sob temperatura de refrigeração. A alface foi centrifugada 10 vezes para eliminar o excesso de água e, então, foi mantida sob refrigeração por uma noite para ser utilizada no experimento de determinação do valor D_{10} .

3.2.3.3 Preparo do inóculo

Cada cepa, mantida sob refrigeração, foi inoculada em caldo tripticase soja (Merck) e incubada a 35–37°C por 20–24 h. Em seguida, foi semeada em 100 mL de caldo tripticase soja (Merck) e incubada a 35–37°C por 18–20h. A partir da segunda cultura das três cepas de *Salmonella*, 15 mL de cada uma delas foram transferidos para um tubo de centrífuga, obtendo um “pool” com 45 mL. O “pool” obtido foi centrifugado a 1.000g (centrífuga CELM LS3 Plus, São Paulo, BR) por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi re-suspenso em 45 mL de solução fisiológica. Para cada microrganismo foram preparados dois “pools”.

O mesmo procedimento foi adotado para o preparo das cepas de *E. coli* O157:H7.

3.2.3.4 Contaminação da alface (NIEMIRA *et al.*, 2002)

As suspensões dos “pools” de *Salmonella* obtidas no item anterior (duas porções de 45 mL) foram transferidas para um recipiente contendo 6 litros de água destilada estéril, previamente resfriada (2 a 4°C), para obter uma suspensão com aproximadamente 10^7 – 10^8 UFC/mL. Após a homogeneização do inóculo, o cesto da centrífuga contendo a alface minimamente processada

foi transferido para o recipiente contendo a suspensão do microrganismo. Este recipiente apresentava as dimensões adequadas para comportar o cesto da centrífuga e manter a alface imersa na suspensão. Decorrido o tempo de 5 minutos, o cesto foi removido e após escorrido o líquido, este transferido para a centrífuga. A alface minimamente processada foi centrifugada 10 vezes para eliminar o excesso de líquido, obtendo um produto com a contaminação aproximada de 10^6 UFC/g. Foram pesados, então, 25 g do produto contaminado em embalagens de polietileno e em seguida seladas. Para cada dose de irradiação foram preparadas três porções. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical (Veco, Campinas, BR).

O mesmo procedimento foi adotado para a contaminação com *E. coli* O157:H7.

3.2.3.5 Processo de irradiação

Três porções de 25 g de alface minimamente processada contaminada com *Salmonella* foram usadas para cada dose de radiação. As doses aplicadas foram de 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 e 1,0 kGy.

Três porções de 25 g de alface minimamente processada contaminada com *E. coli* O157:H7 foram utilizadas para cada dose de radiação. As doses aplicadas foram de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 kGy.

Em ambos os casos, 3 porções de 25 g não foram irradiadas e foram utilizadas como referência para determinar o nível de contaminação inicial do produto.

Todo o processo foi conduzido com as amostras em recipiente isotérmico com gelo, mantendo a temperatura abaixo de 6°C e realizado em três ocasiões distintas.

3.2.3.6 Enumeração dos microrganismos sobreviventes

Cada porção de 25g foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1% por 2 minutos em "stomacher" (Stomacher 400, Seward, London, UK) e, a partir desta suspensão, foram preparadas diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1%. De cada diluição preparada foi transferido 1 mL para placa de Petri sobre a qual foi adicionada ágar tripticase soja (Oxoid), previamente fundido e resfriado a 45–46°C. Este procedimento foi realizado em duplicata. Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 35–37°C por 24 h, quando se procedeu a contagem das colônias das placas com 25 a 250 colônias. De cada placa onde foram feitas as contagens, 10 colônias foram testadas empregando reação de aglutinação em lâmina. Para *Salmonella* foi utilizado soro polivalente "O" (Difco) e para *E. coli* O157:H7 foi utilizado o soro O157 (Difco). Após as contagens, foram calculadas as médias das duplicatas, aplicados os respectivos fatores de correção das diluições e os resultados foram expressos em UFC/g.

3.2.3.7 Cálculo do valor de D₁₀

A partir da enumeração do microrganismo em cada dose, estes dados foram transformados em log UFC/g e com estes valores foi construído um gráfico plotando log UFC/g em função da dose de irradiação real (kGy). Com a equação da reta obtida através de regressão linear, foi calculada a dose em kGy necessária para reduzir um ciclo logarítmico do microrganismo estudado.

3.2.4 Efeito da irradiação sobre a alface americana minimamente processada

Para esta fase do estudo, as amostras foram irradiadas com as doses de 0,9 kGy, correspondendo a 4 vezes o valor de D_{10} obtido para *Salmonella* spp. e com as doses de 0,7 e 1,2 kGy, correspondendo a inomogeneidade do processo de irradiação, ou seja, às doses mínimas e máximas possíveis, considerando as características do processo de irradiação da Embrarad.

O efeito da irradiação sobre a alface americana minimamente processada foi estudado através de dois experimentos, um para avaliar o efeito imediato sobre as características da alface (item 3.2.4.1) e outro para determinar o tempo de vida de prateleira (item 3.2.4.2).

3.2.4.1 Determinação da dose de tolerância

Foram utilizadas quatro amostras de alface americana minimamente processada, picada e embalada em saco de polietileno selado, com 500 g cada e em aerobiose, sendo que cada uma foi irradiada com uma das seguintes doses 0,7, 0,9, e 1,2 kGy além do controle. Todo o processo foi conduzido com as amostras em recipiente isotérmico com gelo, mantendo a temperatura abaixo de 6°C, exceto durante o processamento industrial que foi conduzido com temperatura aproximada de 10°C.

A determinação da dose de irradiação máxima aceitável pela alface americana minimamente processada (picada) foi realizada através de avaliação sensorial pela técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), segundo STONE *et al.* (1974). Foi utilizado um painel treinado composto de 6 pessoas que avaliaram os atributos perda de líquido, odor, textura e cor. A quantificação dessas características foi realizada utilizando uma escala não

estruturada de 9 pontos, ou seja, que contém apenas os extremos, conforme apresentado na Tabela 5.

Os resultados obtidos, para cada atributo, foram avaliados por comparação entre as diferentes doses (0,0; 0,7; 0,9 e 1,2 kGy) através de análises estatísticas utilizando o sistema "Statistic Analysis System – SAS", versão 8 (SAS Institute, Inc., Cary, N.C.), aplicando análises de variância (ANOVA) e teste de médias pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

Tabela 5: Critérios para análise sensorial de alface americana minimamente processada aplicando a técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ, segundo STONE *et al.* (1974)*.

Atributo	Extremos da escala		Método**
	Mínimo (ponto= 0)	Máximo (ponto= 9)	
Perda de líquido	Ausência de líquido	Presença de líquido (exsudado)	Observação da presença de líquido no interior da embalagem fechada
Odor	Fresco, característico de alface e sem alteração	Não fresco, lembrando odor de fermentado	Avaliar o odor como um todo, na amostra inteira (500g)
Textura	Sem crocância ao tato e auditiva	Crocância ao tato e auditiva, característica de alface fresca	Apertar a amostra suavemente com os dedos e observar a crocância ao tato e auditiva, na amostra inteira (500g)
Cor	Verde claro, característica de alface americana	Vermelho-tijolo, principalmente na região do corte	Avaliação visual da cor como um todo, na amostra inteira (500g)

* os atributos e extremos de escala foram estabelecidos em conjunto com o fabricante da alface (comunicação pessoal).

**O método de avaliação foi definido em conjunto com o painel durante o treinamento.

3.2.4.2 Determinação da vida de prateleira da alface minimamente processada irradiada

Foram utilizadas 40 amostras alface americana minimamente processada, picada e embaladas em sacos de polietileno selados, com 500 g cada e em aerobiose. Grupos de 10 amostras foram irradiadas com 3 doses diferentes 0,7, 0,9, e 1,2 kGy e outras 10 amostras foram utilizadas como controle (0,0 kGy). Todo o processo foi conduzido com as amostras em recipiente isotérmico com gelo.

A determinação do tempo de vida de prateleira da alface americana minimamente processada (picada) foi realizada através de avaliação sensorial pela técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), segundo STONE *et al.* (1974), conforme descrito no item 3.2.4.1 e com acompanhamento de análises microbiológicas.

As análises sensoriais foram realizadas nos tempos de zero, 1, 2, 3 e 6 dias após a irradiação com as amostras mantidas sob refrigeração a 4 – 6°C. A escolha de manter a temperatura máxima de 6°C foi por recomendação do fabricante.

Os resultados obtidos para cada atributo foram avaliados separadamente por dose, por comparação entre os diferentes dias após a irradiação, ou seja, zero, 1, 2, 3 e 6 dias. As análises estatísticas foram realizadas através do sistema "Statistic Analysis System – SAS" , versão 8 (SAS Institute, Inc., Cary, N.C.), aplicando análises de variância (ANOVA) e teste de médias pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

As análises microbiológicas foram realizadas nos tempos zero, 2 e 3 dias após a irradiação com as amostras mantidas sob refrigeração a 4 – 6°C. As determinações foram contagem de microrganismos aeróbios mesófilos,

psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, e de *Pseudomonas* spp., e determinação do número mais provável de coliformes totais, coliformes fecais e de *E. coli*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação microbiológica da alface disponível no comércio

As análises microbiológicas da alface minimamente processada apresentaram populações elevadas para os diferentes microrganismos pesquisados (Tabela 6). Para os microrganismos aeróbios mesófilos, as populações variaram entre $4,3 \times 10^4$ e $9,2 \times 10^6$ UFC/g; para psicrotróficos entre $4,9 \times 10^4$ e $7,3 \times 10^6$ UFC/g; para *Enterobacteriaceae* entre $3,9 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^6$ UFC/g; para *Pseudomonas* entre $7,9 \times 10^3$ e $6,0 \times 10^5$ UFC/g e para coliformes entre $2,3 \times 10^1$ e maior que $1,1 \times 10^3$ NMP/g. Não foram detectados coliformes fecais (<3 NMP/g), *E. coli* O157:H7 (em 25g) e *Salmonella* (em 25g).

Estes resultados são compatíveis com os de outros autores que também trabalharam com vegetais minimamente processados. SZABO *et al.* (2000), na Austrália, analisaram 120 amostras de alface minimamente processada, cortada e embalada, adquiridas no comércio e observaram populações de microrganismos aeróbios totais entre 10^3 e 10^9 UFC/g, com 73% das amostras apresentando populações entre 10^5 e 10^7 UFC/g. ALBRECHT *et al.* (1995), nos Estados Unidos, avaliando a qualidade de ingredientes para saladas, analisaram 36 amostras de alface adquiridas no comércio de Lincoln, Nebraska, e obtiveram populações (médias) de $5,0 \times 10^5$ UFC/g para microrganismos aeróbios e de $2,5 \times 10^5$ UFC/g para coliformes.

SORIANO *et al.* (2000) analisaram 144 amostras de alface servidas em restaurantes universitários na Espanha e observaram populações de microrganismos aeróbios totais entre 10^3 e $6,5 \times 10^7$ UFC/g. PALÚ *et al.* (2002) avaliando a qualidade de saladas servidas em restaurantes universitários do Rio de Janeiro, Brasil, para 9 amostras de alface sem mistura com outros vegetais, obtiveram contagens de microrganismos aeróbios totais entre $2,0 \times 10^5$ e $2,7 \times 10^7$ UFC/g, coliformes totais entre $1,4 \times 10^3$ e $2,4 \times 10^4$ NMP/g, coliformes fecais entre $8,2 \times 10^2$ e $2,4 \times 10^4$ NMP/g e *Salmonella* em uma amostra.

Tabela 6: Avaliação microbiológica em 15 amostras de alface minimamente processada (folhas inteiras embaladas em atmosfera modificada e pronta para consumo) adquiridas no comércio da cidade de São Paulo (06 a 10/2002).

Nº	Tempo (dias)		Aeróbios mesófilos (UFC/g)	Psicrotróficos (UFC/g)	Enterobacteriaceae (UFC/g)	Pseudomonas spp (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	E. coli O157:H7 (em 25g)	Salmonella spp (em 25g)
	da embalagem	para vender								
01	5	0	$7,1 \times 10^5$	$4,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente
02	4	2	$2,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente
03	4	2	$1,6 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$8,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente
04	5	1	$3,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$	<3	Ausente	Ausente
05	4	2	$9,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$6,1 \times 10^4$	$4,6 \times 10^2$	<3	Ausente	Ausente
06	3	3	$8,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$7,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^1$	<3	Ausente	Ausente
07	4	3	$1,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente
08	3	4	$3,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$	$7,4 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$4,6 \times 10^2$	<3	Ausente	Ausente
09	4	3	$4,6 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$4,7 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente
10	4	0	$4,8 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente
11	4	3	$7,1 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$	$4,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$	<3	Ausente	Ausente
12	4	2	$1,4 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^1$	<3	Ausente	Ausente
13	4	2	$4,3 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	$4,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente
14	3	4	$3,6 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$4,7 \times 10^4$	$7,9 \times 10^3$	$4,3 \times 10^1$	<3	Ausente	Ausente
15	2	5	$6,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^3$	<3	Ausente	Ausente

Tabela 7: Avaliação microbiológica de 20 amostras de alface americana “in natura” (em cabeça) adquiridas no comércio da cidade de São Paulo (06 a 08/2002).

Amostra	Aeróbios Mesófilos	<i>Enterobacteriaceae</i>
	(UFC/g)	(UFC/g)
01	$1,1 \times 10^6$	$4,1 \times 10^4$
02	$9,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
03	$1,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$
04	$2,4 \times 10^6$	$7,9 \times 10^3$
05	$1,7 \times 10^7$	$6,6 \times 10^6$
06	$4,1 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$
07	$1,7 \times 10^7$	$8,4 \times 10^5$
08	$8,3 \times 10^5$	$3,7 \times 10^3$
09	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^5$
10	$1,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^4$
11	$9,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$
12	$2,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$
13	$2,9 \times 10^6$	$4,4 \times 10^4$
14	$2,3 \times 10^5$	$9,2 \times 10^4$
15	$5,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$
16	$3,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$
17	$7,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$
18	$2,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^3$
19	$1,2 \times 10^3$	$9,0 \times 10^1$
20	$1,7 \times 10^4$	$8,8 \times 10^2$

No presente estudo, para as amostras de alface em cabeça (Tabela 7), as populações de microrganismos aeróbios mesófilos variaram entre $1,2 \times 10^3$ e $4,1 \times 10^7$ UFC/g e para *Enterobacteriaceae* as populações variaram entre $9,0 \times 10^1$ e $6,6 \times 10^6$ UFC/g. Estes dados estão de acordo com os de KING et al. (1991) que constataram variação de $4,1 \times 10^3$ a 1×10^7 UFC/g, dependendo do grau de sujidades aderidas nas folhas e da quantidade de folhas externas excluídas.

ERCOLANI (1976), em Bari na Itália, detectou 68,3% de positividade para *Salmonella* em 120 amostras de alface adquiridas no varejo em estudo realizado durante 2 anos. Nessa pesquisa, os resultados médios para microrganismos aeróbios totais foram de $6,6 \times 10^7$ UFC/g, para coliformes totais $5,9 \times 10^4$ UFC/g, para coliformes fecais $6,1 \times 10^3$ UFC/g e para *Enterococos* $2,2 \times 10^2$ UFC/g.

Na presente pesquisa, os níveis de microrganismos aeróbios mesófilos e de *Enterobacteriaceae* encontrados em alface minimamente processada pronta para o consumo (Tabela 6) foram semelhantes aos encontrados nas amostras de alface em cabeça (Tabela 7), o que leva a suspeitar que o processamento da alface não foi realizado de maneira adequada e/ou ocorreu multiplicação dos microrganismos que sobreviveram ao processamento mínimo.

De fato, os procedimentos de higiene e sanificação são fundamentais para a redução da microbiota da alface. O tratamento clássico para o processamento mínimo da maioria dos vegetais contempla a aplicação de solução clorada porém, para melhor conservação, recomenda-se que a temperatura tanto no processamento quanto na conservação seja próxima do congelamento ou até no máximo de 4°C, de preferência até 2°C (ALBRECHT et al., 1995; ODUMERU et al., 1997). A legislação do Estado de São Paulo (São Paulo, 1999) permite que produtos refrigerados sejam mantidos em temperaturas de até 10°C; entretanto, considerando as informações obtidas na

literatura, esta temperatura é problemática na conservação da alface minimamente processada.

Vários estudos confirmam que a temperatura inadequada na conservação é o fator principal para o aumento da carga microbiana. Segundo KING *et al.* (1991), a microbiota da alface ("iceberg") aumenta em aproximadamente duas escalas logarítmicas após 8 dias de estocagem sob refrigeração. ODUMERU *et al.* (1997) observaram que os níveis da microbiota de diferentes vegetais processados e estocados eram maiores do que os encontrados nos vegetais não processados. A 4°C, a população passou de $7,1 \times 10^4$ UFC/g para $4,3 \times 10^5$, $2,5 \times 10^6$ e $6,6 \times 10^6$ UFC/g após 4, 7 e 11 dias, respectivamente. Porém, quando mantidos a 10°C, a população atingiu $2,5 \times 10^6$ UFC/g em apenas 4 dias. ALBRECHT *et al.* (1995), avaliando vegetais não processados e adquiridos no comércio de Lincoln, Nebraska, EUA, observaram que as temperaturas de conservação eram elevadas, entre 8,7 e 18,9°C, e as contagens médias para microrganismos aeróbios foram de $5,0 \times 10^5$ UFC/g e para coliformes de $2,5 \times 10^5$ UFC/g.

Dentre os microrganismos predominantes em alface minimamente processada, observamos *Pseudomonas* e membros da família *Enterobacteriaceae*, conforme apresentado nas Tabelas 6, 8, 9 e 10, o que também foi observado por outros autores.

Segundo KING *et al.* (1991), a microbiota da alface minimamente processada é composta por bactérias Gram negativas tanto no produto fresco quanto no produto após estocagem sob refrigeração e os gêneros mais freqüentes são *Pseudomonas* (56,7%), *Serratia* (8,1%) e *Erwinia* (8,1%). GARG *et al.* (1990) também confirmaram *Pseudomonas* como os microrganismos predominantes.

SORIANO *et al.* (2000), analisando amostras de salada de alface, obtiveram positividade de 84,0% para *Enterococcus*, 25,7% para *E. coli*, 22,9% para *Staphylococcus aureus*, 14,6% para *Citrobacter freundii*, 10,4% para

Aeromonas hydrophila, 8,3% para *Klebsiella pneumoniae*, 4,2% para *Enterobacter cloacae*, 2,8% para *Pseudomonas aeruginosa* e 1,4% para *Providencia* spp. Não foram detectados *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* O157:H7.

SZABO *et al.* (2000) identificaram entre os microrganismos psicrotróficos e patogênicos pesquisados em alface minimamente processada, *Listeria monocytogenes* (2,5%), *Aeromonas* (incluindo *A. hydrophila* e *A. caviae*) (55,0%) e *Yersinia enterocolitica* (59,2%).

Apesar de no presente estudo *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 não terem sido detectadas nas amostras de alface minimamente processada, os níveis de *Enterobacteriaceae* ($4,0 \times 10^6$ UFC/g) e de coliformes ($1,1 \times 10^3$ NMP/g) encontrados indicam que é possível a ocorrência de surtos de ETA envolvendo esse tipo de alimento, como veículo daqueles microrganismos, como os casos apresentados na Tabela 2.

4.2 Avaliação microbiológica durante o processamento da alface americana

Nesta etapa, a redução da contaminação microbiológica foi avaliada em três etapas do processado mínimo da alface: seleção, após lavada e cortada e já na sua embalagem final (sanificada e centrifugada).

Na etapa de seleção da alface (Tabelas 8, 9 e 10), observou-se que o grupo de microrganismos que apresentou as maiores populações foi o dos aeróbios mesófilos ($2,8 \times 10^4$ a $3,9 \times 10^6$ UFC/g), seguido pelo grupo dos microrganismos psicrotróficos ($6,2 \times 10^4$ a $1,9 \times 10^6$ UFC/g); *Pseudomonas* ($<10^2$ a $8,4 \times 10^6$ UFC/g); *Enterobacteriaceae* ($2,5 \times 10^3$ a $6,3 \times 10^5$ UFC/g); coliformes (<3 a $1,1 \times 10^3$ NMP/g); coliformes fecais e *E. coli* (<3 a 23 NMP/g). *E. coli* O157:H7 (em 25g) e *Salmonella* (em 25g) não foram detectados.

Tabela 8: Populações de microrganismos em alface americana minimamente processada, nas diferentes etapas – Processo industrial – Experimento 1 (89 mgCl/L)

Microrganismos	Selecionada	Lavada	Pronto para Consumo	Redução (%)**
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	$2,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$6,4 \times 10^3$	99,7
	$1,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	
	$2,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	
	$4,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$	
	$7,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	
	média* $1,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$	
Pscicrotróficos (UFC/g)	$6,7 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	96,2
	$1,8 \times 10^6$	$4,4 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	
	$7,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$6,3 \times 10^3$	
	$4,1 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	
	$1,4 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	
	média $6,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	
<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	$1,9 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	96,1
	$6,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	
	$5,5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	
	$1,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$9,0 \times 10^2$	
	$1,3 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	
	média $8,0 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$3,1 \times 10^3$	
<i>Pseudomonas</i> (UFC/g)	$4,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$	96,7
	$5,9 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$< 10^2$	
	$5,7 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$	
	$< 10^2$	$2,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	
	$2,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	
	média $1,4 \times 10^4$	$9,7 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	
Coliformes totais (NMP/g)	$4,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	$2,8 \times 10^1$	88,2
	$1,5 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	
	$1,5 \times 10^2$	$7,3 \times 10^0$	$2,3 \times 10^1$	
	< 3	$4,3 \times 10^1$	$3,6 \times 10^0$	
	$2,4 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	
	média $1,7 \times 10^2$	$3,8 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	
Coliformes fecais (NMP/g)	23	< 3	< 3	-
	< 3	< 3	< 3	
	< 3	< 3	< 3	
	< 3	7,3	< 3	
	9,1	< 3	< 3	
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	23	< 3	< 3	-
	< 3	< 3	< 3	
	< 3	< 3	< 3	
	< 3	7,3	< 3	
	< 3	< 3	< 3	

* média dos 5 resultados; **calculado sobre as médias

Tabela 9: Populações de microrganismos em alface americana minimamente processada, nas diferentes etapas – Processo industrial – Experimento 2 (162 mgCl/L)

Microrganismos	Selecionada	Lavada	Pronto para Consumo	Redução (%)**
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	$8,9 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$	98,2
	$6,9 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	
	$6,1 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	
	$4,3 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	$7,8 \times 10^3$	
	$5,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3$	
média*	$5,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^3$	
Psicrotroficos (UFC/g)	$9,4 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	95,6
	$7,9 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$	
	$6,2 \times 10^4$	$7,3 \times 10^5$	$7,9 \times 10^3$	
	$4,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$7,3 \times 10^3$	
	$3,3 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$8,2 \times 10^3$	
média	$5,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	
Enterobacteriaceae (UFC/g)	$3,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	$8,3 \times 10^2$	96,3
	$1,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$9,2 \times 10^2$	
	$2,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	
	$1,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$	
	$1,9 \times 10^4$	$9,6 \times 10^3$	$7,3 \times 10^2$	
média	$5,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^3$	
Pseudomonas (UFC/g)	$6,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	94,6
	$7,7 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	
	$4,2 \times 10^4$	$6,5 \times 10^5$	$9,0 \times 10^3$	
	$8,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	
	$3,9 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$	$7,9 \times 10^4$	
média	$4,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	
Coliformes totais (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	92,2
	< 3	$2,1 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	
	$3,5 \times 10^1$	$3,6 \times 10^0$	$2,3 \times 10^1$	
	$4,6 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	
	$2,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	
média	$3,2 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^1$	
Coliformes fecais (NMP/g)	<3	<3	<3	-
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
Escherichia coli (NMP/g)	<3	<3	<3	-
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	

* média dos 5 resultados; **calculado sobre as médias

Tabela 10: Populações de microrganismos em alface americana minimamente processada, nas diferentes etapas – Processo industrial – Experimento 3 (171 mgCl/L)

Microorganismos	Selecionada	Lavada	Pronto para Consumo	Redução (%)**
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	$5,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	98,3
	$1,3 \times 10^6$	$8,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	
	$9,8 \times 10^5$	$4,2 \times 10^3$	$5,1 \times 10^4$	
	$3,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^3$	$9,6 \times 10^3$	
	$2,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	
	média* $1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	
Pscicrotróficos (UFC/g)	$1,9 \times 10^6$	$3,8 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	97,9
	$3,8 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$4,8 \times 10^3$	
	$6,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$	
	$1,3 \times 10^6$	$5,9 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$	
	$9,6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$	
	média $1,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	
<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	$7,8 \times 10^4$	$3,7 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$	90,0
	$1,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	
	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$5,6 \times 10^4$	
	$6,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	
	$4,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	
	média $2,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	
<i>Pseudomonas</i> (UFC/g)	$8,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$	99,6
	$2,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$	
	$8,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	
	$4,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$	
	$7,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$	$7,1 \times 10^3$	
	média $2,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$	
Coliformes totais (NMP/g)	$1,5 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	90,4
	$1,1 \times 10^3$	$9,1 \times 10^0$	$2,3 \times 10^1$	
	<3	$4,3 \times 10^1$	$3,6 \times 10^0$	
	$9,1 \times 10^0$	$9,1 \times 10^0$	$4,3 \times 10^1$	
	$3,6 \times 10^0$	$3,6 \times 10^0$	$9,1 \times 10^0$	
	média $2,5 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	$2,4 \times 10^1$	
Coliformes fecais (NMP/g)	<3	<3	<3	-
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<3	<3	<3	-
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	
	<3	<3	<3	

* média dos 5 resultados; **calculado sobre as médias

Na alface após a sanificação e centrifugação (Tabelas 8, 9 e 10), verificou-se, nos 3 experimentos, que os microrganismos aeróbios mesófilos apresentaram as maiores contagens ($2,5 \times 10^3$ a $7,5 \times 10^4$ UFC/g), seguidos por psicotróficos ($4,3 \times 10^3$ a $5,2 \times 10^4$ UFC/g), *Enterobacteriaceae* ($7,3 \times 10^2$ a $5,2 \times 10^4$ UFC/g), *Pseudomonas* ($<10^2$ a $7,9 \times 10^4$ UFC/g) e coliformes ($3,6$ a $4,3 \times 10^1$ NMP/g). Não foram detectados coliformes fecais, *E. coli* (<3 NMP/g), *E. coli* O157:H7 (em 25g) e *Salmonella* (em 25g).

Em relação à redução das contaminações, o processo apresentou melhores resultados para o grupo dos microrganismos aeróbios mesófilos (98,2 a 99,7%), seguido por psicotróficos (95,6 a 97,9%), *Pseudomonas* (94,6 a 99,6%), *Enterobacteriaceae* (90,0 a 96,3%) e coliformes (88,2 a 92,2%). A baixa redução dos coliformes pode ser explicada pela heterogeneidade das populações destes microrganismos na alface em cabeça (<3 a $1,1 \times 10^3$ NMP/g), o que dificulta as comparações.

Como já apresentado anteriormente, as reduções variaram de acordo com o grupo de microrganismos e, neste caso, estiveram entre 0,9 e 2,7 ciclos logarítmicos. As menores reduções foram observadas para coliformes (0,9 a 1,2 ciclos) e *Enterobacteriaceae* (1,0 a 1,6 ciclos) que, dentre os microrganismos pesquisados, são indicadores de contaminação fecal e têm relação com o risco de contaminação por patógenos de origem intestinal como *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, entre outros.

Os dados obtidos indicam que o processo utilizado garante redução de apenas 1 ciclo logarítmico para o grupo *Enterobacteriaceae*. A maior população dessa família na alface antes de lavar e sanificar foi de $6,3 \times 10^5$ UFC/g e, após sanificação e centrifugação, a maior foi de $5,6 \times 10^4$ UFC/g.

Na literatura há indicação de que o processamento mínimo da alface, utilizando solução clorada, pode reduzir de 1 a 2 ciclos logarítmicos, podendo atingir até 4 escalas logarítmicas (NGUYEN-the & CARLIN, 1994; ODUMERU *et al.*, 1997; BEUCHAT, 2000). SORIANO *et al.* (2000) avaliaram a eficiência

de solução clorada em alface e concluíram que há redução de mais de 2 ciclos logarítmicos na contagem de microrganismos aeróbios totais e de, no mínimo, 1 ciclo para coliformes.

WEISSINGER *et al.* (2000) verificaram a redução de 1 ciclo logarítmico na população de *Salmonella* Baildon, inoculada em níveis de 10^3 UFC/g em tomate cortado em cubos e em alface picada e tratados com 120 a 200 mg Cl/L. Apesar dessa redução aumentar para 2 ciclos ao longo de 12 dias quando mantidos a 4°C, o microrganismo não foi eliminado. Mesmo com inóculos de 4 a 7 UFC/g e tratamento com 200 mg Cl/L, *Salmonella* ainda foi detectada. E, em tomate armazenado a 21–30°C, verificou-se a sua multiplicação.

LI *et al.* (2001) estudaram o efeito da aplicação a 20°C e 50°C, de solução clorada na concentração de 20 mg/L sobre *E. coli* O157:H7 em alface cortada ("iceberg") e não observaram redução significativa quando comparado com o mesmo tratamento na ausência de cloro. No mesmo estudo, observaram redução na contagem de *E. coli* O157:H7, quando o produto esteve estocado a 5°C por 18 dias, e a 15°C ocorreu aumento de 2 a 3 ciclos logarítmicos em dois dias e continuou aumentando lentamente até o sétimo dia.

DELAQUIS *et al.* (2002) avaliaram o efeito da lavagem a 4°C e a 47°C da alface ("iceberg") com solução clorada (100 mg/L) sobre *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Para *E. coli* O157:H7, a redução a 4°C foi de 1 ciclo logarítmico e a 47°C foi maior que 2 ciclos. Em nenhum dos casos ocorreu a total eliminação. A população diminuiu quando o produto foi estocado a 1°C e aumentou quando a 10°C.

WATCHEL & CHARKOWSKI (2002) também demonstraram que solução clorada reduz a contagem de *E. coli* O157:H7 em alface picada ("iceberg") porém não é capaz de eliminá-la.

A eficiência da ação desinfetante do cloro na redução dos patógenos para níveis seguros é influenciada pelas contaminações iniciais elevadas, pelas

características do produto como dobras e irregularidades que alojam as sujidades e os contaminantes, pela cera superficial do vegetal que envolve os contaminantes, pelas fissuras e pelos cortes.

Outro fator, recentemente estudado, é a capacidade de formação de biofilmes, por alguns microrganismos, nas superfícies de vegetais. FETT (2000) confirmou que a formação de biofilmes em brotos de vegetais se inicia durante o cultivo, podendo ser detectado já no primeiro dia.

Dentre os diferentes fatores citados acima, as fissuras e os cortes das folhas de alface têm papel importante para a sobrevivência de *E. coli* O157:H7. Alguns estudos têm demonstrado que este microrganismo tem a propriedade de aderir e penetrar nos tecidos a partir das fissuras (SEO & FRANK, 1999, TAKEUCHI *et al.*, 2001).

TAKEUCHI *et al.* (2000) estudaram como alguns microrganismos aderem à folha de alface ("iceberg"). As células de *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* aderem, preferencialmente, à região dos cortes, enquanto *Pseudomonas fluorescens* o faz nas superfícies intactas e *Salmonella* Typhimurium adere tanto às superfícies intactas quanto à região dos cortes.

Segundo TAKEUCHI & FRANK (2000), *E. coli* O157:H7 penetra nos tecidos atingindo uma profundidade de até 73 μm e se aloja preferencialmente na junção das células da alface ("icebeg"). Os mesmos autores (TAKEUCHI & FRANK, 2001b) demonstraram que na profundidade de 30 a 40 μm , 68% das células de *E. coli* O157:H7 sobrevivem ao tratamento com 200 mg de cloro livre por litro, com redução de apenas 0,4 a 0,5 ciclos logarítmicos. Além da barreira física, a matéria orgânica que envolve as células inativa o cloro.

Além de cloro, TAKEUCHI & FRANK (2001a) também testaram a eficiência de soluções alcalinas de bicarbonato de sódio e uma solução surfactante, com reduções de 0,2 a 0,4 e 0,7 a 1,1 ciclos, respectivamente. A sobrevivência de *E. coli* O157:H7 foi devida ao fato de as células bacterianas terem penetrado nos tecidos da alface ("iceberg").

Estudos têm demonstrado que a internalização de *E. coli* O157:H7 pode ocorrer antes da colheita da alface. Durante o cultivo desse produto, a bactéria migra através das raízes para o interior dos tecidos da planta a partir do solo e/ou da água de irrigação contaminados (SOLOMON *et al.*, 2002a; SOLOMON *et al.*, 2002b, WATCHEL *et al.*, 2002). No interior dos tecidos, *E. coli* O157:H7 permanece viável e não é afetada pela ação dos processos de sanificação com soluções cloradas (TAKEUCHI & FRANK, 2001a; TAKEUCHI & FRANK, 2001b; SOLOMON *et al.*, 2002a; SOLOMON *et al.*, 2002b).

Estes estudos, demonstrando que *E. coli* O157:H7 penetra nos tecidos internos da alface a partir das folhas e das raízes, explicam a ineficiência dos processos tradicionais de higienização e sanificação e evidenciam a importância da qualidade das águas de irrigação e dos adubos orgânicos empregados nos cultivos de alface, ou seja, quando estes materiais estiverem contaminados a alface estará contaminada e o processamento mínimo não será capaz de eliminá-la.

Da mesma forma que descrito para *E. coli* O157:H7, outros microrganismos também podem penetrar nos tecidos da alface, o que indica que os procedimentos tradicionais podem não ser eficientes.

4.3 Irradiação da alface

O tratamento por irradiação foi testado com o objetivo de verificar sua eficiência e aplicabilidade para a segurança do consumidor, justificado pelos surtos envolvendo vegetais crus, conforme evidenciado na Tabela 2 e pela ineficiência na redução microbiana no processamento mínimo demonstrada no item 4.2.

No caso da irradiação, a destruição dos microrganismos independe das interferências que tornam ineficientes as desinfecções com soluções cloradas. Os mecanismos de ação da irradiação gama sobre os seres vivos é

classificado como efeito direto e como efeito indireto. O efeito direto é aquele que ocorre sobre o DNA da célula, causando-lhe injúria letal ou injúria subletal. Já o efeito indireto ocorre quando o raio ionizante atinge a molécula de água formando radicais livres que reagem com outras moléculas provocando diversas alterações que podem ou não ser letais para os seres vivos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Dentre os fatores que aumentam a radiorresistência de um microrganismo tem-se a ausência de oxigênio e/ou presença de substâncias redutoras porque diminuem as reações de oxidação, e a baixa temperatura do produto durante o processo, porque reduzem a velocidade das reações químicas. Por outro lado, o alto teor de água de um alimento, a temperatura mais elevada durante o processo de irradiação, a presença de oxigênio e microrganismos com crescimento na fase exponencial aumentam a sensibilidade dos microrganismos (FRANCO & LANDGRAF, 1996). No trabalho de THAYER & BOYD (1993) com carne congelada, o valor D_{10} com o produto na temperatura de 20°C foi 2 vezes menor que a -20°C.

No caso da alface, onde o teor de proteínas é baixo e o de água é alto, a sensibilidade do microrganismo tende a ser maior. Porém, as condições da embalagem em ar, a vácuo ou em atmosfera modificada podem alterar os efeitos da radiação.

Segundo BEUCHAT *et al.* (2001a, 2001b), os estudos sobre a descontaminação de vegetais e frutos apresentam várias dificuldades. Devido às características de cada vegetal, dos diferentes procedimentos adotados para a inoculação do microrganismo em estudo e de metodologias de análise, a comparação entre os resultados e a sua discussão ficam comprometidos.

4.3.1 Determinação do valor D_{10} para *Salmonella*

No presente estudo, observamos que a dose de radiação gama para reduzir 90% da população de *Salmonella* em alface minimamente processada e irradiada em temperatura de refrigeração ($5\pm 1^\circ\text{C}$) variou entre 0,16 e 0,23 kGy, conforme apresentado na Figura 1.

Não foram encontrados, na literatura, dados de valor D_{10} para *Salmonella* em alface o que nos remete a comparações com outros vegetais frescos, para os quais também existem poucos dados.

RAJKOWSKI & THAYER (2000) obtiveram em brotos de rabanete valores de D_{10} de 0,46 a 0,54 kGy para *Salmonella*. FARKAS (1998) apresenta para couve-flor e batata cozida, valores de 0,46 e 0,59 kGy, respectivamente. Essas doses representam aproximadamente o dobro das obtidas neste estudo.

Para produtos alimentícios em geral o valor D_{10} para *Salmonella* varia entre 0,10 e 1,29 kGy, dependendo do produto (FARKAS, 1998; RADOMYSKI *et al.*, 1994; RAJKOWSKI & THAYER, 2000, SANTOS, 1997). A razão da grande variação está relacionada principalmente com a presença de compostos que protegem os microrganismos da ação dos raios ionizantes, aumentando, em consequência, a sua radiorresistência, com os fatores que facilitam o surgimento de radicais livres e, portanto diminuem a radiorresistência dos microrganismos (DIEHL, 1990) e também pode variar de acordo com o planejamento e condução do experimento incluindo, entre outros, a forma de inoculação do microrganismo, as características do processo de irradiação e o método de análise empregado para quantificar os microrganismos sobreviventes.

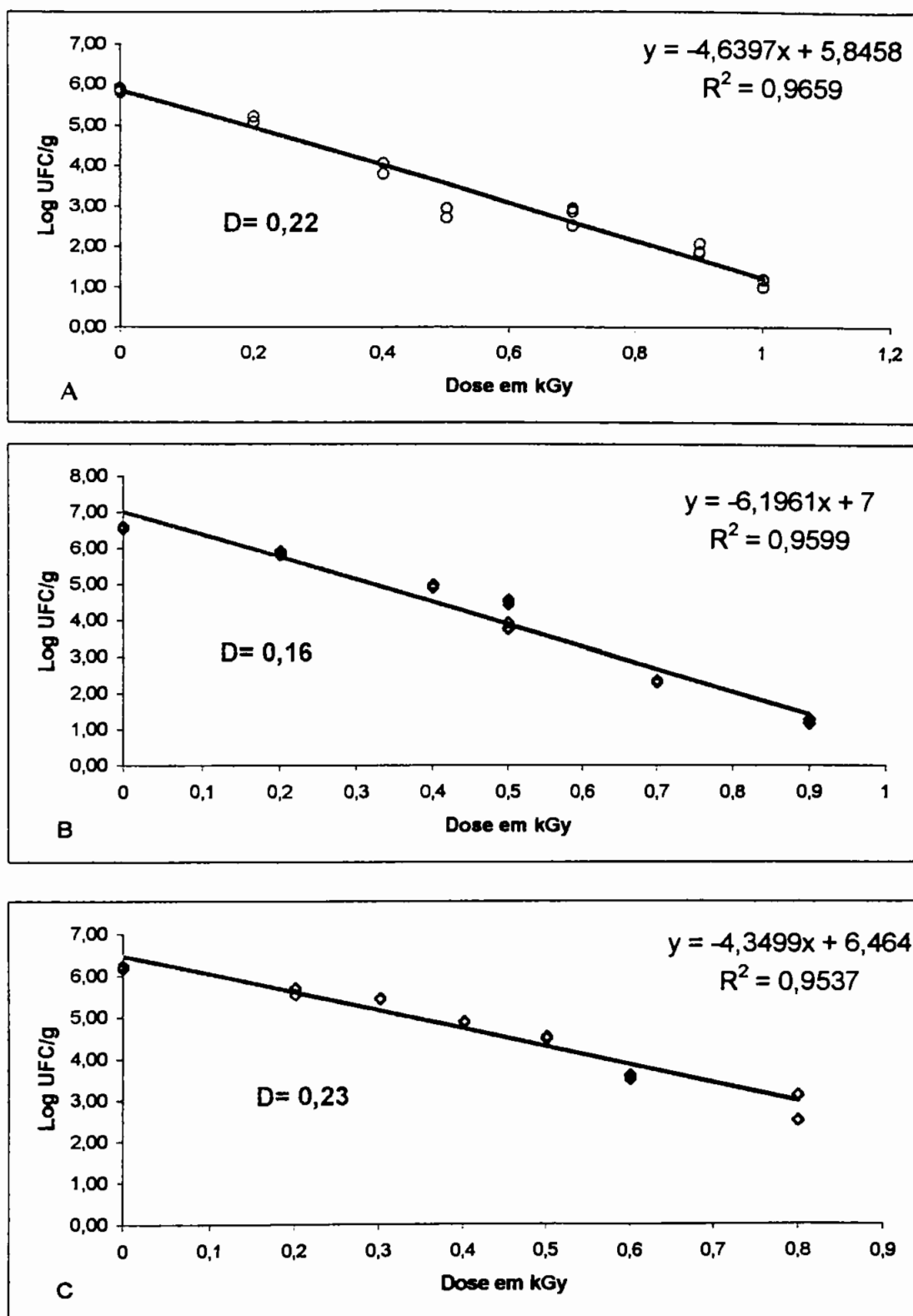


Figura 1: Sobrevivência de *Salmonella* spp. inoculada artificialmente em alface americana minimamente processada, exposta a diferentes doses de radiação gama. A: experimento I; B: experimento II e C: experimento III.

4.3.2 Determinação do valor D_{10} para *E. coli* O157:H7

Para *E. coli* O157:H7, observamos que a dose de irradiação gama para reduzir 90% da população variou entre 0,11 e 0,12 kGy, conforme apresentado na Figura 2. Da mesma forma que o caso anterior, referem-se à alface irradiada em temperatura de refrigeração e embalada em aerobiose.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por NIEMIRA *et al.* (2002) para quatro variedades de alface. Esta concordância pode ter sido principalmente pelo fato de que os experimentos foram planejados de forma semelhante. O valor D_{10} para alface de folha vermelha ("red leaf") foi de 0,119 kGy e para alface de folha verde ("green leaf") de 0,123 kGy, significativamente menores do que aqueles para alface "iceberg" de 0,136 kGy e para alface "Boston" de 0,140 kGy. Nesse mesmo estudo, os valores de D_{10} também foram determinados em homogeneizados das quatro espécies de alface com o objetivo de verificar o efeito da radiação no interior dos tecidos. Os valores foram de 0,339 kGy para alface de folha vermelha ("red leaf"), 0,326 kGy para folha verde ("green leaf") e 0,331 kGy para alface "Boston", significativamente maiores do que o valor obtido para alface "iceberg" (0,092 kGy).

Para outros vegetais frescos como brotos de vegetais (brocoli, alface e rabanete), as doses variaram de 0,26 a 0,34 kGy (RAJKOWSKI & THAYER, 2000).

BUCHANAN *et al.* (1998), utilizando suco de maçã como substrato, obtiveram valores entre 0,12 e 0,21 kGy para cepas não ácido-adaptadas, 0,26 a 0,35 kGy para cepas ácido-adaptadas e ainda de 0,26 a 0,34 kGy, dependendo do teor de sólidos do suco.

Para produtos alimentícios em geral, o valor D_{10} varia de 0,12 a 0,42 kGy (BUCHANAN *et al.*, 1998; FARKAS, 1998; THAYER & BOYD, 1993; RADOMYSKI *et al.*, 1994; RAJKOWSKI & THAYER, 2000; CHIRINOS, 2002; NIEMIRA, 2002).

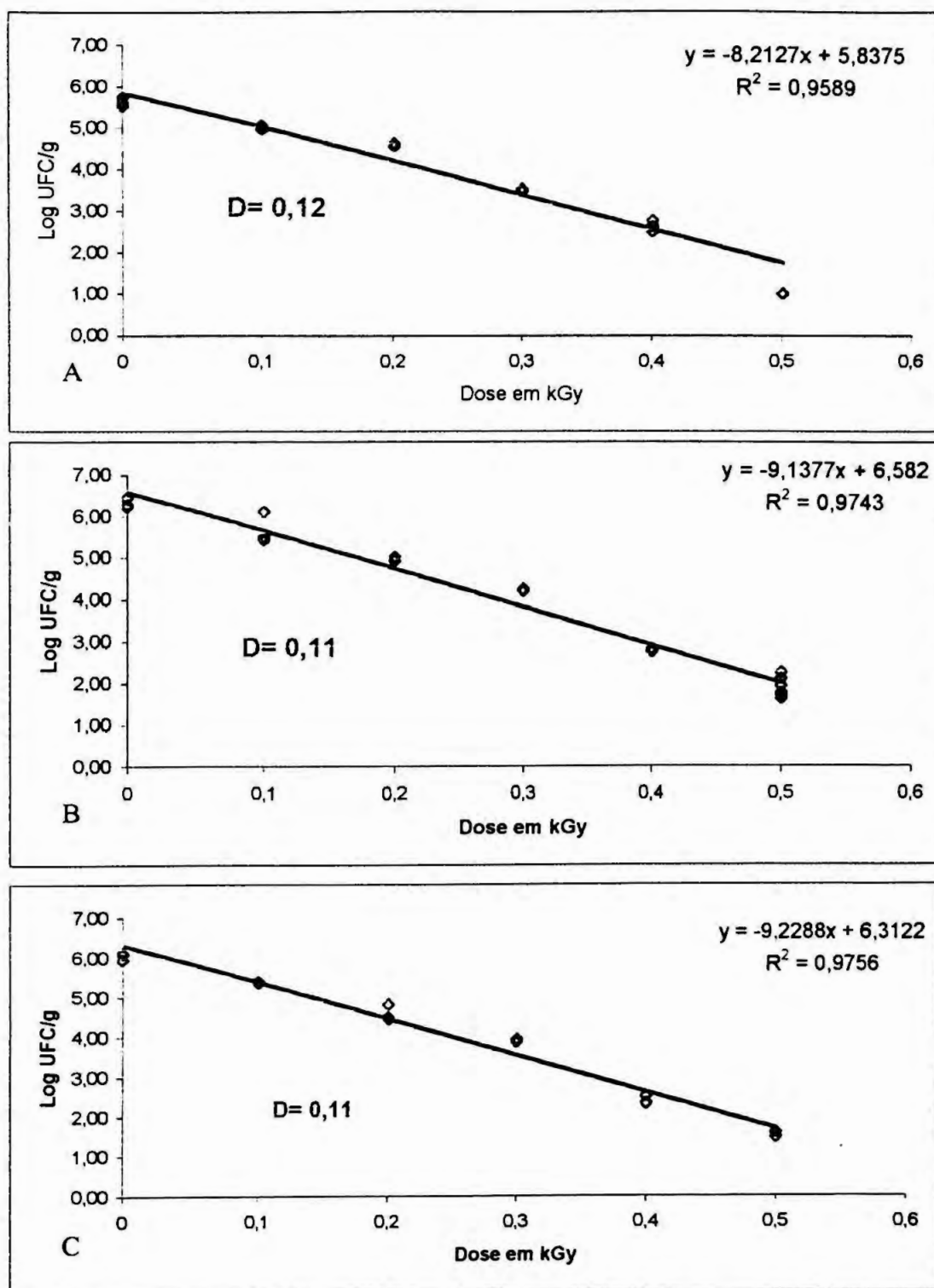


Figura 2: Sobrevivência de *E. coli* O157:H7 inoculada artificialmente em alface americana minimamente processada, exposta a diferentes doses de radiação gama. A: experimento I; B: experimento II e C: experimento III.

4.3.3 Efeito da radiação gama sobre os atributos sensoriais da alface americana minimamente processada

Vários estudos indicam que a irradiação de vegetais provoca alteração dos atributos sensoriais. Em alguns casos, dependendo da variedade do vegetal, melhora as características e em outros provoca a perda de qualidade. Em cenoura, a radiação melhorou a cor e o sabor, porém a textura ficou comprometida, quando comparada com o tratamento com solução clorada. (CHERVIN & BOISSEAU, 1994). A alteração da textura está associada à degradação da pectina provocada pela radiação (YU *et al.*, 1996).

Para avaliar o efeito da irradiação sobre a alface, as amostras foram irradiadas com as doses de 0,7, 0,9 e 1,1 kGy, correspondendo respectivamente a aproximadamente 3, 4 e 5 vezes o valor de D_{10} obtido para *Salmonella* spp. Foram feitos dois estudos, um para avaliar o efeito após a irradiação (Tabela 11), e outro para determinar o tempo de vida de prateleira da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e irradiada (Tabela 12, 13, 14 e 15).

Os dados apresentados na Tabela 11 demonstram que os atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada e embalada em aerobiose, não é afetada pela irradiação gama, nas doses de 0,7 e 0,9 kGy, quando comparada com a mesma alface não irradiada. Com a dose de 1,1 kGy, observou-se que a textura apresenta diminuição estatisticamente significativa, indicando que esta dose não deve ser empregada para alface americana.

Na literatura existem poucos dados dos efeitos da irradiação sobre a alface americana e os dados publicados avaliaram doses mais baixas que as testadas neste experimento.

NIEMIRA *et al.* (2002) demonstraram que doses de até 0,5 kGy não alteraram significativamente a textura de quatro variedades alface. FOLEY *et al.* (2001) e HAGENMAIER & BAKER (1997) também não observaram alterações nas características visuais e na textura da alface ("iceberg") embalada sob atmosfera modificada e irradiada com dose de 0,5 kGy. Entretanto HAGENMAIER & BAKER (1997) demonstraram que há alteração da textura da alface quando tratada com dose de 0,81 kGy .

Tabela 11: Análise sensorial utilizando a técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa – ADQ para os atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada e embalada em aerobiose, após a irradiação com três doses diferentes, além do controle*.

Atributo	Doses			
	0,0 kGy	0,7 kGy	0,9 kGy	1,1 kGy **
Perda de líquido	0,00 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a	0,02 ^a
Odor	1,20 ^a	1,38 ^a	1,14 ^a	1,32 ^a
Textura	5,86 ^a	4,56 ^a	5,38 ^a	3,30 ^b
Cor	0,02 ^a	0,14 ^a	1,34 ^a	0,22 ^a

* painel treinado composto por 6 analistas

** dose real obtida quando a planejada foi de 1,2 kGy.

Letras iguais significam que não há diferença significativa entre as doses, com $p < 0,05$.

O estudo de vida de prateleira foi feito para a alface americana minimamente processada, picada e embalada em aerobiose, não irradiada e irradiada com as doses de 0,7, 0,9, e 1,1 kGy (Tabela 12, 13, 14 e 15).

Para a alface minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e não irradiada (Tabela 12), a vida de prateleira foi de 2 dias, por apresentar

diferença significativa no atributo cor após 2 dias da fabricação. Também apresentou diferença estatisticamente significativa para o atributo odor após 3 dias. No período de 6 dias não houve alteração nos atributos perda de líquido e textura.

No estudo realizado por PRIEPKE *et al.* (1976), a alface ("iceberg") cortada, embalada em aerobiose e armazenada a 4,4°C, manteve as características de aparência e "flavor" em níveis aceitáveis por 8 e 6 dias, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por KING *et al.* (1991) que também observaram que o aspecto visual da alface ("iceberg") embalada sob aerobiose permanecia aceitável por até 8 dias, quando mantida a 2°C.

A diferença observada entre estes dois resultados e os que estamos apresentando pode ser explicada pela diferença da temperatura de armazenamento (4 a 6°C) e pela temperatura de processamento (aproximadamente 10°C), que é o principal fator negativo para a manutenção das qualidades sensoriais da alface. Nosso estudo, no entanto, foi conduzido com as temperaturas apresentadas que refletem de forma mais adequada as condições de produção e comercialização da alface em São Paulo.

Já para alface tratada com dose de 0,7 kGy (Tabela 13) a vida de prateleira foi de 3 dias, por apresentar diferença significativa no atributo odor após 3 dias da irradiação. Apesar do atributo cor não apresentar diferença significativa, por precaução é possível adotar a vida de prateleira de 2 dias uma vez que a pontuação obtida para cor foi semelhante à obtida para a amostra controle.

Para a amostra de alface irradiada com a dose de 0,9 kGy (Tabela 14), a vida de prateleira foi de 2 dias, por apresentar diferença significativa no atributo odor após 2 dias da irradiação e cor após 3 dias. Também observou-se diferença estatisticamente significativa para o atributo textura após 3 dias, o que não foi observado para o controle e para a dose de 0,7kGy.

Tabela 12: Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) para os atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Controle (não irradiada)*.

Atributo	Tempo				
	zero**	1 dia	2 dias	3 dias	6 dias
Perda de líquido	0,00 ^a	0,06 ^a	0,00 ^a	0,12 ^a	0,14 ^a
Odor	1,20 ^c	3,16 ^{bc}	2,98 ^{bc}	5,94 ^a	3,70 ^{ab}
Textura	5,86 ^a	4,02 ^a	5,30 ^a	4,56 ^a	4,94 ^a
Cor	0,02 ^b	0,60 ^{ab}	1,60 ^a	1,74 ^a	1,96 ^a

* painel treinado composto por 6 analistas

** tempo de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ após a irradiação.

Letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tempos, com $p < 0,05$.

Tabela 13 Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) para os atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Irradiada com dose de 0,7 kGy*.

Atributo	Tempo					
	Controle	zero**	1 dia	2 dias	3 dias	6 dias
Perda de líquido	0,00 ^a	0,04 ^a	0,06 ^a	0,00 ^a	0,10 ^a	0,14 ^a
Odor	1,20 ^b	1,38 ^b	2,16 ^b	2,22 ^b	5,74 ^a	5,70 ^a
Textura	5,86 ^a	4,56 ^a	4,02 ^a	4,40 ^a	5,26 ^a	4,94 ^a
Cor	0,02 ^b	0,14 ^b	0,60 ^{ab}	1,62 ^{ab}	1,62 ^{ab}	1,96 ^a

* painel treinado composto por 6 analistas

** tempo de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ após a irradiação.

Letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tempos, com $p < 0,05$.

Tabela 14 Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) dos atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Irradiada com dose de 0,9 kGy*.

Atributo	Tempo					
	Controle	zero**	1 dia	2 dias	3 dias	6 dias
Perda de líquido	0,00 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a	0,00 ^a	0,10 ^a	0,08 ^a
Odor	1,20 ^c	1,14 ^c	2,62 ^{bc}	4,68 ^{ab}	6,38 ^a	7,38 ^a
Textura	5,86 ^a	5,38 ^{ab}	4,82 ^{ab}	3,74 ^{abc}	1,88 ^c	2,90 ^{bc}
Cor	0,02 ^b	1,34 ^{ab}	0,38 ^{ab}	2,18 ^{ab}	2,94 ^a	1,30 ^{ab}

* painel treinado composto por 6 analistas

** tempo de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ após a irradiação.

Letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tempos, com $p<0,05$.

Tabela 15: Vida de prateleira, determinada através da técnica estatística de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) dos atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Irradiada com dose de 1,1 kGy*.

Atributo	Tempo					
	Controle	zero**	1 dia	2 dias	3 dias	6 dias
Perda de líquido	0,00 ^a	0,02 ^a	0,04 ^a	0,00 ^a	0,26 ^a	1,26 ^a
Odor	1,20 ^c	1,32 ^c	1,20 ^c	4,34 ^b	5,88 ^a	5,48 ^{ab}
Textura	5,86 ^a	3,30 ^b	3,78 ^{ab}	3,32 ^b	1,80 ^b	1,86 ^b
Cor	0,02 ^b	0,22 ^b	0,54 ^b	2,34 ^{ab}	3,00 ^a	1,60 ^{ab}

* painel treinado composto por 6 analistas

** tempo de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ após a irradiação.

Letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tempos, com $p<0,05$.

No caso da alface irradiada com 1,1 kGy (Tabela 15), o atributo textura apresentou pontuação mais baixa, estatisticamente significativa, no mesmo dia do tratamento. Também apresentou alterações de odor e de cor 2 e 3 dias após o tratamento, respectivamente.

Na literatura, encontramos apenas um trabalho informando que com dose de 0,81 kGy, a textura da alface ("iceberg") diminui 2 dias após a irradiação (HAGENMAIER & BAKER, 1997). Nesse trabalho, a dose aplicada variou de 0,68 a 0,94 kGy, o que é compatível com o dado que obtivemos em que dose de 0,9 kGy apresentou diminuição da textura 3 dias após a irradiação (Tabela 14).

Na Tabela 16 são apresentados os resultados das análises microbiológicas de acompanhamento do estudo de vida de prateleira. As populações de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e *Enterobacteriaceae* encontradas no controle no tempo zero são semelhantes às encontradas na alface minimamente processada, apresentadas e discutidas no item 4.2. Não foram detectados coliformes (< 3 NMP/g) nem *Pseudomonas* (< 100 UFC/g) durante o estudo.

As três doses de irradiação testadas reduziram 2 a 3 ciclos logarítmicos as populações de microrganismos aeróbios mesófilos que, após 3 dias a 5°C se mantiveram entre 10 e 10^2 UFC/g.

A mesma redução foi observada para as populações de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, onde níveis de 10^3 UFC/g foram reduzidos para < 10 UFC/g após a irradiação (dose 0,7, 0,9 e 1,1 kGy) e se mantiveram assim até 3 dias após o tratamento.

Tabela 16: Avaliação microbiológica das amostras dos estudos de vida de prateleira da alface americana minimamente processada, picada, embalada em aerobiose e mantida a $5\pm 1^\circ\text{C}$, para as diferentes doses de irradiação.

Microrganismos	Tempo*	Doses			
		controle	0,7 kGy	0,9 kGy	1,1 kGy
Contagem de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Zero	2,4x10 ³ 1,7x10 ⁴	10 ¹ 1,5x10 ²	10 ¹ 2,0x10 ¹	10 ¹ 3,0x10 ¹
	2 dias	4,1x10 ⁴ 4,7x10 ⁴	<10 <10	<10 2,0x10 ¹	<10 4,0x10 ¹
	3 dias	1,8x10 ⁴ 1,2x10 ⁵	1,9x10 ² 4,3x10 ²	9,0x10 ¹ 3,1x10 ²	<10 10 ¹
	Zero	7,0x10 ² 5,6x10 ³	<10 <10	<10 <10	<10 <10
	2 dias	2,4x10 ⁴ 3,4x10 ⁴	<10 <10	<10 <10	<10 <10
	3 dias	3,9x10 ³ 3,1x10 ⁴	<10 <10	<10 <10	<10 <10
<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	Zero	1,0x10 ² 4,0x10 ³	<10 <10	<10 <10	<10 <10
	2 dias	6,7x10 ³ 1,4x10 ⁴	<10 <10	<10 <10	<10 <10
	3 dias	1,2x10 ³ 2,5x10 ⁴	<10 <10	<10 <10	<10 <10

* tempo de armazenamento a $5\pm 1^\circ\text{C}$ após a irradiação.

O aumento da população microbiana após 3 dias a 4 - 6°C foi de aproximadamente um ciclo logarítmico para os diferentes tratamentos e coincidem com os dados de PRIEPKE *et al.* (1976) que observaram aumento de dois ciclos após quatro dias a 4,4°C. KING *et al.* (1991) também avaliaram o comportamento da população microbiana em alface em função da temperatura e demonstraram que esta aumenta 2 ciclos após 8 dias e não há diferença significativa entre as temperaturas de 2, 5 e 7,5°C.

Estas informações permitem concluir que a alface minimamente processada pode manter a segurança microbiológica quando estocada em temperaturas inferiores a 7°C e que as qualidades sensoriais são melhor preservadas com temperatura abaixo de 4°C.

4.3.4 Dose de irradiação recomendada para alface

Considerando a recomendação de redução de 5 ciclos logarítmicos (NACMCF, 1999), a segurança do consumidor dependerá da população dos microrganismos patogênicos presentes no alimento, que normalmente é desconhecida.

Para avaliar a segurança do consumidor, estimamos que a população de *Salmonella* e de *E. coli* O157:H7 em alface "in natura" pode chegar aos níveis encontrados para coliformes e para *Enterobacteriaceae*, o que seria o pior cenário.

Para coliformes, o maior valor encontrado foi de $1,1 \times 10^3$ NMP/g (Tabelas 7, 8, 9 e 10) e, levando em consideração que pela tabela de NMP este valor pode variar até $4,8 \times 10^3$ /g, foi assumido o valor de 10^4 /g.

Para *Enterobacteriaceae*, o maior valor encontrado foi de $8,4 \times 10^5$ UFC/g (Tabelas 7, 8, 9 e 10) e foi assumido o valor de 10^6 /g.

Os dados obtidos nos experimentos durante o processamento da alface indicam redução de 0,9 a 1,2 ciclos logarítmicos para coliformes e de 1 a 1,6 para *Enterobacteriaceae* (Tabelas 8, 9 e 10). Estes dados mostram que se obtém, em média, redução de 1 ciclo logarítmico durante o processamento mínimo da alface, o que nos conduz para níveis de 10^3 /g para coliformes e para níveis de 10^5 /g para *Enterobacteriaceae*.

Para obter a redução de 5 ciclos logarítmicos, conforme a recomendação, ainda é necessário um tratamento capaz de reduzir, no mínimo 4 ciclos, que com a irradiação da alface pode ser obtida através da aplicação de doses de 0,92 kGy para *Salmonella* e de 0,49 kGy para *E. coli* O157:H7. Considerando a presença dos dois microrganismos, a dose requerida seria de 0,92 kGy.

No caso de *E. coli* O157:H7, a dose de 0,49 kGy é semelhante à indicada por FOLEY (2001) que recomenda tratamento com solução clorada a 200 mg/L em associação com uma dose de 0,55 kGy para reduzir 5 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7 em alface picada.

Com a dose de 0,92 kGy, a redução de *E. coli* O157:H7 pode chegar a 7,5 ciclos logarítmicos. Considerando 10^3 /g, como referência a partir do nível de coliformes, a contaminação seria reduzida para 1 célula/100g em 100 embalagens de 100g. Entretanto, quando se considera 10^5 /g, como referência a partir do nível de *Enterobacteriaceae*, a contaminação seria reduzida para 1 célula/100g.

Para *Salmonella*, com a dose de 0,92 kGy, a redução pode chegar a 4 ciclos logarítmicos. Considerando 10^3 /g, como referência a partir do nível de coliformes, a contaminação se reduziria para 10 células/100g. Entretanto, quando se considera 10^5 /g, como referência a partir do nível de *Enterobacteriaceae*, a contaminação se reduziria para 10 células/g ou seja 1000 células/100g, o que não garante a segurança do consumidor.

Considerando que tanto *Salmonella* quanto *E. coli* O157:H7 são de origem intestinal, a referência do nível de contaminação com base em coliformes totais e *Enterobacteriaceae* está super estimando a contaminação potencial da alface, já que o indicador de contaminação fecal amplamente adotado é o do grupo dos coliformes fecais que, neste estudo, apresentou populações variando deste < 3 NMP/g até 23 NMP/g (Tabelas 8, 9 e 10).

Porém, outros estudos indicam ocorrência de coliformes fecais em níveis mais elevados do que os obtidos no presente estudo. SANT'ANA *et al.* (2002) detectaram em amostras de alface crespa minimamente processada com populações superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/g para *E. coli*. PALÚ *et al.* (2002), no Brasil, analisaram 15 amostras de salada de alface de restaurantes da Universidade Federal do Rio de Janeiro e encontraram coliformes fecais entre 82 NMP/g e $2,4 \times 10^4$ NMP/g e *Salmonella* em 4 amostras. *E. coli* O157:H7 não foi detectado.

Estes dados indicam que, em ambos os casos, a matéria prima não apresentava boa qualidade e o processamento não foi eficiente. Nestes casos, a irradiação também não será eficiente uma vez que a dose requerida será alta e por consequência afetará as características sensoriais. Para níveis elevados, utilizando como referência os valores encontrados para coliformes fecais, acima de 10^4 /g, a dose de irradiação seria maior que 0,92 kGy.

Portanto, para garantir níveis abaixo das doses infecciosas, 50 células para o caso da *Salmonella* (FRANCO & LANDGRAF, 1996) e 1 a 4 células para *E. coli* O157:H7 (DUNCAN & HACKNEY, 1994, a irradiação da alface com dose de 0,92 kGy não será suficiente se não forem seguidas as boas práticas de higiene (GHP), desde a fase de cultivo até a mesa ("from farm to fork").

Considerando este estudo, é possível obter alface minimamente processada com níveis de contaminações relativamente baixos (como apresentado nas Tabelas 8, 9, 10 e 16) e a irradiação com doses de 0,7 a 0,9 kGy podem reduzir os contaminantes para níveis seguros.

Com as informações obtidas nesta pesquisa podemos concluir que a recomendação de que o processamento de vegetais deve reduzir 5 ciclos logarítmicos, baseado em estudo com sementes, não se aplica indistintamente. Para o caso da alface, o principal fator que determina a eficiência do processamento mínimo e a viabilidade do tratamento por irradiação são as boas práticas durante o cultivo, principalmente em relação à qualidade microbiológica do solo, do adubo orgânico e da água de irrigação.

Para alface americana, o processamento mínimo em associação com dose de 0,7 a 0,9 kGy de irradiação gama, seguramente permite reduções de 4 a 4,9 ciclos logarítmicos para *Salmonella* spp. e de 6,8 a 8,5 para *E. coli* O157:H7, ou seja, pode tornar a alface segura quando os desvios das boas práticas de higiene causarem contaminações com populações de *Salmonella* spp. e de *E. coli* O157:H7 inferiores a $5,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições deste estudo, permitem concluir que:

- a alface americana (*Lactuca sativa*, L.) minimamente processada (folha picada) apresenta risco potencial para o consumidor devido às condições de cultivo e às limitações do processamento que não garante a redução das populações de microrganismos patogênicos para níveis considerados seguros.

- a vida de prateleira da alface minimamente processada (folha picada), embalada em aerobiose, exposta à dose de 0,9 kGy e mantida a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ é de dois dias, devido à alteração no atributo odor.

- a aplicação de radiação gama (^{60}Co) nas doses entre 0,7 e 0,9 kGy, em associação com boas práticas de higiene, aumenta a segurança microbiológica de alface minimamente processada, pois permite a redução de *Salmonella* spp. e de *Escherichia coli* O157:H7 para níveis considerados seguros sem alterar os atributos sensoriais do produto.

6 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. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.177, n.6, p.1588-1593, 1998.
- ALBRECHT, J.A., HAMOUZ, F.L., SUMMER, S.S., MELCH, V. Microbial evaluation of vegetable ingredients in salad bars. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, p.683-685, 1995.
- ALZAMORA, S.M., LÓPEZ-MALO, A., TAPI, M.S. Overview. In: ALZAMORA, S.M., TAPIA, M.S., LÓPEZ-MALO, A., eds. **Minimally processed fruits and vegetables: fundamental aspects and applications**. Gaithersburg: Aspen, 2000. p.1-9.
- ANDREWS, W.H., FLOWERS, R.S., SILLIKER, J., BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWLES, F.P., ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.357-380.
- BALLANTYNE, R.S., SELMAN, J.D. Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. **Int. J. Food Sci. Technol.**, Oxford, v.23, p.267-274, 1988.
- BELONGIA, E.A., MacDONALD, K.L., PARHAM, G.L., WHITE, K.E., KORLATH, J.A., LOBATO, M.N., STRAND, S.M., CASALE, K.A., OSTERHOLM, M.T., An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.164, p.338-343, 1991.
- BESSER, R.E., LETT, S.M., WEBER, J.T., DOYLE, M.P., BARRET, T.J., WELLS, J.G., GRIFFIN, P.M. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic

- syndrome from *Escherichi coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.269, p.2217-2220, 1993.
- BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.59, n.2, p.204-216, 1996.
- BEUCHAT, L.R. Surface disinfection of raw product. **Dairy Food Environ. Sanit.**, Ames, n.12, p.6-9, 1992.
- BEUCHAT, L.R. Use of sanitizers in raw fruit and vegetables processing. In: ALZAMORA, S.M., TAPIA, M.S., LÓPEZ-MALO, A., eds. Minimally processed fruits and vegetables: fundamental aspects and applications. Gaithersburg: Aspen, 2000. p.63–78.
- BEUCHAT, L.R., FARBER, J.M., GARRETT, E.H., HARRIS, L.J., PARISH, M.E., SUSLOW, T.V., BUSTA, F.F. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.7, p.1079-1084, 2001a.
- BEUCHAT, L.R., HARRIS, L.J., WARD T.E., KAJIS, T.M. Development of a proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.8, p.1103-1109, 2001b.
- BLOSTEIN, J. An outbreak of *Salmonella javiana* associated with consumption of watermelon. **J. Environ. Health**, Denver, v.56, p.29-31, 1991.
- BOLIN, H.R., HUXSOLL, C.C. Effects of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. **J. Food Sci.**, Chicago, v.56, n.1, p.60-64, 1991.
- BOLIN, H.R., STAFFORD, A.E., KING Jr., A.D., HUXSOLL, C.C. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. **J. Food Sci.**, Chicago, v.42, n.5, p.1319-1321, 1977.

BUCHANAN, R.L., EDELSON, S.G., SNIPES, K., BOYL, G. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by irradiation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.64, n.11, p.4533-4535, 1998.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Foodborne outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* - Rhode Island and New Hampshire, 1993. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, Atlanta, v.43, n.5, p.81, 87-88, 1994.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 – Illinois, 1995. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.31, n.45, p.437-439, 1996a.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Montevideo infections. EPI-AID 93-79, 1993. Apud: TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice – British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.45, n.44, p.975, 1996b.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating alfalfa sprouts – Michigan and Virginia – June-July 1997. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.46, n.32, p.741-744, 1997.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating fresh cheese curds – Wisconsin, June 1998. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, Atlanta, v.49, n.40, p.911-9013, 2000a.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice – United States and Canada, – June 1999. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.48, n.27, p.582-585, 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Salmonella* serotype Kottbus infections associated with eating alfalfa sprouts – Arizona, California, Colorado, and New Mexico, February – April 2001. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.51, n.1, p.7-9, 2002a.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary foodnet data on the incidence of foodborne illnesses: selected sites, United States, 2001. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.51, n.15, p.325-329, 2002b.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary foodnet data on the incidence of foodborne illnesses: selected sites, United States, 2000. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.50, n.13, p.241-246, 2001.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary foodnet data on the incidence of foodborne illnesses: selected sites, United States, 1999. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.49, n.10, p.201-205. 2000b.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Salmonella* Oranienburg gastroenteritis associated with consumption of pre-cut watermelon. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, Atlanta, v.28, p.522-523, 1979.

Apud: TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Salmonella typhimurium* outbreak traced to a commercial apple cider-New Jersey. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, Atlanta, v.24, p.87-88, 1975. Apud: TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.

CHERVIN, C., BOISSEAU, P. Quality maintenance of "ready-to-it" shredded carrots by gamma irradiation. **J. Food Sci.**, Chicago, v.59, n.2, p.359-361, 1994.

CHIRINOS, R.R.O., VIZEU, D.M., DESTRO, M.T., FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers by gamma irradiation. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.33, p.53-56, 2002.

COOK, K., BOYCE, T., LANGKOP, C., KUO, K., SWARTZ, M., EWERT, D., SOWERS, E., WELLS, J., TAUXE, R. A multistate outbreak of *Shigella flexneri* 6 traced to imported green onions. Abstract no. k72, 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, Washington D.C., 17 to 20 Sept 1995. p.300. 1995. Apud: TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.

COOK, K., SWERDLOW, D., DOBBS, T., WELLS, J., PUHR, R., HLADY, G., GENESE, C., FINELLI, L., TOTH, B., BODAGER, D., PILOT, K., GRIFFIN, P. Fresh-squeezed *Salmonella*: an outbreak of *Salmonella* Hartford infections associated with unpasteurized orange juice in Florida. Abstract no. K49, 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, Washington D. C., 15 to 18 sept 1996. p.259. Apud: TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.

COUSIN, M.A., JAY, J.M., VASSAVADA, P.C. Psychrotropic microorganisms. In: DOWLES, F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.159-166.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST (CSPI). Product-related outbreaks 1990-1999. Disponível em: <http://www.cspinet.org>. Acesso em: 03/10/2002.

DAVIS, H., TAYLOR, J.P., PERDURE, J.N., STELMA Jr, G.N., HUMPHREYS Jr, J.M., ROWNTREE III, R., GREENE, K.D. A shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.128, n.6, p.1312-1321, 1988.

DELAQUIS, P., STEWART, S., CAZAUX, S., TOIVONEN, P. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to eat iceberg lettuce washed in warm chlorinated water. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.65, n.3, p.459-464, 2002.

DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods**. New York. Marcel Dekker, 1990. 345p. (Food science and technology, 68).

- DOYLE, M.P., ZHAO, T., MENG, J., ZHAO, S. *Escherichia coli* O 157:H7. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p.193-213.
- DUNCAN, S.E., HACKNEY, C.R. Relevance of *Escherichia coli* O 157:H7 to the dairy industry. **Dairy Food Environ. Sanit.**, Ames, v.14, p.656-660, 1994.
- DUNN, R.A., HALL, W.N., ALTAMIRANO, J.V., DIETRICH, C.E., ROBINSON-DUNN, B., JOHNSON, D.R. Outbreak of *Shigella flexneri* linked to salad prepared at a central commissary in Michigan. **Public Health Rep.**, Washington, v.110, n.5, p.580-586, 1995.
- ERCOLANI, G.L. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.31, n.6, p.847-852, 1976.
- FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.44, p.189-204, 1998.
- FARKAS, J. Microbiological safety of irradiated foods. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.9, p.1-15, 1989.
- FETT, W.F. Naturally occurring biofilms on alfalfa and others types of sprouts. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, n.5, p.625-632, 2000.
- FOLEY, D.M., KREUTZEN, A., RODRIGUEZ, L., PRAKASH, A. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in shredded iceberg lettuce by chlorination and gamma irradiation, 2001 [Comunicação pessoal].
- FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.33-82.
- FRANSON, M.A. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20.ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 1998. p.4-63-4-64.

- FROST, J.A., McEVOY, M.B., BENETLEY, C.A., ANDERSSON, Y. An outbreak of *Shigella sonnei* infection associated with consumption of iceberg lettuce. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.1, n.1, p.26-29, 1995.
- GARCÍA-GIMENO, R.M., ZURERA-COSANO, G. Determination of ready-to eat vegetable salad shelf-life. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.36, p.31-38, 1997.
- GARG, N., CHUREY, J.J., SPLITTSTOESSER, D.F. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.8, p.701-703, 1990.
- HAGENMAIER, R.D., BAKER, R.A. Low-dose irradiation of cut iceberg lettuce in modified atmosphere packaging. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.2864-2868, 1997.
- HAGENMAIER, R.D., BAKER, R.A. Microbial population of shredded carrot in modified atmosphere packaging as related to irradiation treatment. **J. Food Sci.**, Chicago, v.63, p.162-164, 1998.
- HAMZA, F., CASTAIGNE, F., WILLEMONT, C., DOYON, G., MAKHLOUF, J. Storage of minimally processed romaine lettuce under controlled atmosphere. **J. Food Qual.**, Trumbull, v.19, p.177-188, 1996.
- HILBORN, E.D., MERMIN, J.H., MSHAR, P.A., HADLER, V.L., VOETSCH, A., WAJTKNSKI, C., SWRTZ, M., MSHA, R. LAMBERTPFAIR, M.A. FARRAR, J.A., GLYNN, M.K., SLUTSKER, L. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.159, n.15, p.1758-1764, 1999.
- HONISH, L. NGUYEN, Q. Outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 913 gastroenteritis associated with mung bean sprouts-Edmonton, 2001. **Can. Commun. Dis. Rep.**, v.27, n.18, p.151-156, 2001. Disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 05/10/2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (ICMSF). **Microorganismos in foods: microbiological specifications of food pathogens**. London: Blakie, 1996. v.5, p.217-264.

ISAACSON, M., CANTER, P.H., EFFLER, P., ARNTZEN, L. BOMANS, P., HEENEN, R. Haemorrhagic colitis epidemic in Africa. **Lancet**, London, v.341, p.961, 1993.

JAQUETT, C.B., BEUCHAT, L.R., MAHON, B.E. Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella Stanley* inoculated onto alfalfa sprouts seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, p.2211-2215, 1996.

JOHNSON, J.L., ROSE, B.E., SHARAR, A.K., RANSOM, G.M., LATTUADA, C.P., MCNAMARA, A.M. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, n.6, p.597-603, 1995.

KAPPERUD, G., RORVIK, L.M., HASSELTVEDT, V., HOIBY, E.A., IVERSEN, B.G., STAVELAND, K., JOHNSEN, G., LEITAO, J., HERIKSTAD, H., ANDERSSON, Y. Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.3, p.609-614, 1995.

KEENE, W.E., McANULTY, J.M., HOESLY, F.C., WILLIAMS Jr., L.P., HEDBERG, K., OXMAN, G.L, BARRETT, T.L., PFALLER, M.A., FLEMING, D.W. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.331, n.9, p.579-584, 1994.

KING Jr., A.D., MAGNUSON, J.A., TÖRÖK, T., GOODMAN, N. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **J. Food Sci.**, Chicago, v.56, n.2, p.459-461, 1991.

KORNACKI, J.L., JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWLES, F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.69-82.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. In: ROITMAM, I., TRAVASSOS, L.R., AZEVEDO, J.L. Tratado de microbiologia. São Paulo: Manole, 1988. v.1, p.1-76.

LEITÃO, M.F.F. **Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1979. 148p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

LI, Y., BRACKET, R.E., CHEN, J., BEUCHAT, L.R. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5 or 15°C. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.3, p.305-309, 2001.

MAHON, B.E., PÖNKÄ, A., HAL, W., KOMATSU, L., BEUCHAT, L., DIETRICH, S., SIITONEN, A., GAGE, G., LAMBERT-FAIR, M., HAYES, P., BEAN, N., GRIFFIN, P., SLUTSKER, L. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seed. Abstract no. k48, 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, Washington D.C., 15 to 18 sept 1996. p. 259. Apud: MANHANI, M.R. Desempenho da metodologia para isolamento e contagem de *Escherichia coli* O157:H7 em leite e queijo e sua ocorrência em queijo Minas frescal produzido comercialmente. Campinas, 2000. 90p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas).

- MARTIN, D.L., GUSTAFSON, T.L., PELOSI, J.W., SUAREZ, L., PIERCE G.V.
Contaminated produce a common source for two outbreaks of *Shigella* gastroenteritis. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.124, p. 299-305, 1986.
- MARTÍNES, A., DÍAZ, R.V., TAPIA, M.S. **Microbial ecology of spoilage and pathogenic flora associates to fruits and vegetables.** In: ALZAMORA, S.M., TAPIA, M.S., LÓPEZ-MALO, A., eds. *Minimally processed fruits and vegetables: fundamental aspects and applications.* Gaithersburg: Aspen, 2000. p.43-62.
- MENG, J., FENG, P., DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWLES, F.P., ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.331-341.
- MERMIN, J., MEAD, J.P., GENSHEIMER, K., GRIFFIN, P. Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections among Boy Scouts in Maine. Abstract no. k44, 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, Washington D.C., 15 to 18 sept 1996. p. 258. Apud: TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.
- MICHINO, H., ARAKI, K., MINAMI, S., TAKAYA, S., SAKAI, N., MIYAZAKI, M., ONO, A., YANAGAWA, H. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.150, n.8, p.787-796, 1999.
- MOHLE-BOETANI, J.C., REPORTER, R., WERNER, S.B., ABBOTT, S., FARRAR, J., WATERMAN, S.H., VUGIA, D.J. An outbreak of *Salmonella*

serogroup Saphra due to cantaloupes from Mexico. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180, n.4, p.1361-1364, 1999.

MORGAN, D., NEWMAN, C., HUTCHINSON, D.N., WALKER, A.M., RAWE, B., MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yogurt. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.111, p.181-187, 1993.

MORTON, D.R. Aerobic plate count. In: DOWLES, F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.63-67.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seed. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.52, p.123-153, 1999.

NGUYEN-the, C., CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.34, n.4, p.371-401, 1994.

NIEMIRA, B.A., SOMMERS, C.H., FAN, X. Suspending lettuce type influences recoverability and radiation sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.65, n.9, p.1388-1393, 2002.

O'MAHONY, M., COWDEN, J., SMYTH, B., LYNCH, D., HALL, M., ROWE, B., TEARE, E.L., TETTMAR, R.E., RAMPLING, A.M., COLES, M. An outbreak of *Salmonella* Saint-Paul infection associated with beansprouts. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.104, n.2, p.229-235, 1990.

ODUMERU, J.A., MITCHELL, S.J., ALVES, D.M., LYNCH, J.A., YEE, A.J., WANG, S.L., STYLIADIS, S., FARBER, J.M. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.8, p.954-960, 1997.

- OOI, P.L., GOH, K.T., NEO, K.S., NGAN, C.C. A shipyard outbreak of salmonellosis traced to contaminated fruits and vegetables. **Ann. Acad. Med.** Singapore, v.26, n.5, p.539-543, 1997. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 05/10/2002.
- PALÚ, A.P., TIBANA, A., TEIXEIRA, L.M., LEMOS MIGUEL, M.A., PYRRHO, A.S., LOPES, H.R. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, servidas em restaurantes "self-service" privados, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.16, n.100, p.67-74, 2002.
- PORTNOY, B.L., GOEPFERT, J.M., HARMON, S.M. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetables sprouts. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.103, n.6, p.589-594, 1976.
- PRAKASH, A., GUNER, A.R., CAPORASO, F., FOLEY, D.M. Effects of low-dose gamma irradiation on the shelf life on the quality characteristics of cut romaine lettuce packaged under modified atmosphere. **J. Food Sci.**, Chicago, v.65, n.3, p.549-553, 2000.
- PRIEPKE, P.E, WEI, L.S., NELSON, A.I. Refrigerated storage of prepackaged salad vegetables. **J. Food Sci.**, Chicago, v.41, p.379-382, 1976.
- ProMED. 2002. *E. coli* O157, Ground Beef-USA. Disponível em: <http://www.promedmail.org>. Acesso em: 12/10/2002.
- RADOMYSKI, T., MURANO, E.A., OLSON, D.G., MURANO, P.S. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: a review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.1, p.73-86, 1994.
- RAJKOWSKI, K.T., THAYER, D.W. Reduction of *Salmonella* spp and strains of *Escherichia coli* O157:H7 by gamma radiation of inoculated sprouts. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, n.7, p.871-875, 2000.

- RICE, E.W., JOHNSON, D.K., WILD, D.K., REASONER, D.J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with foodborne disease outbreak of hemorrhagic colitis, **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.15, p.38-40, 1992.
- RILEY, L.V., REMIS, R.S., HELGERSON, S.O., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., HEBERT, R.J., OLCOTT, E.S., JOHNSON, L.M. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Engl. Med.**, Boston, v.308, n.12, p.681-685, 1983.
- SANT'ANA, A. AZEREDO, D.P., COSTA, M., CACEDO, V. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.16, n.101, p.80-84, 2002.
- SANTOS, A.F. **Determinação da dose de radiação gama para destruição de *Samonella spp.* em carne de frango.** São Paulo, 1997. 71p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- SÃO PAULO. Leis, Decretos, etc. Portaria CVS 6/99 de 10 de março de 1999. Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, aprova regulamento técnico que estabelece os parâmetros e critérios para controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos.
- SCHLECH, W.F., LAVIGNE, P.M., BOSTOLUSSI, R.A., ALLEN, A.C., HALDANE, E.V., WORT, A.J., HIGHTOWER, A.W., JOHNSON, S.E., KING, S.H., NICHOLS, S.E., BROOME, C.V. Epidemics listeriosis - evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.308, p.203-206, 1983.
- SEO, K.H., FRANK, J.F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, p.3-9, 1999.

- SOLOMON, E.B., POTENSKI, C.J., MATTHEWS, K.R. Effects of irrigation methods on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.65, n.4, p.673-676, 2002a.
- SOLOMON, E.B., YARON, S., MATTEWS K.R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.68, n.1, p.397-400, 2002b.
- SORIANO, J.M., RICO, H., MOLTO, J.C., MANES, J. Assesment of the microbiological quality and wash treatment of lettuce served in university restaurants. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.58, n.1/2, p.123-128, 2000.
- STONE, H., SIDEL, J., OLIVER, S., WOOLSEY, A., SINGLETON, N.C. sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technol.**, Chicago, n.28, p.24-34, 1974.
- STRATTON, J., STEFANIW, L., GRIMSRUD. K., WERKER, D.H., ELLIS, A., ASHTON, E., CHUI, L., BLEWETT, E., AHMED, R., CLARK, C., RODGERS, F., TROTTIER, L., JENSEN, B. Outbreak of *Salmonella paratyphi* B var java due to contaminated alfalfa sprouts in Alberta, British Columbia and Saskatchewan. **Can. Commun. Dis. Rep.**, v.27, n.16, p.133-138, 2001. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 05/10/2002.
- SWANSON, K.M.J., PETRAN, R.L., HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWLES, F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001.p.53-62.
- SZABO, E.A., SCURRAH, K.J., BURROWS, J.M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.30, n.6, p.456-460, 2000.

- TAKEUCHI, K., FRANK, J.F. Direct microscopic observation of lettuce leaf decontamination with a prototype fruit and vegetable washing solution and 1% NaCl-NaHCO₃. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.8, p.1235-1239, 2001a.
- TAKEUCHI, K., FRANK, J.F. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, n.4, p.434-440, 2000.
- TAKEUCHI, K., FRANK, J.F. Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157:H7 from chlorine disinfection. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.2, p.147-151, 2001b.
- TAKEUCHI, K., HASSAN, A.N., FRANK, J.F. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.11, p.1820-1823, 2001.
- TAKEUCHI, K., MATUTE C.M., HASSAN A.N., FRANK, J.F. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, n.10, p.1433-1437, 2000.
- TAORMINA, P.J., BEUCHAT, L.R. Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.4, p.318-324, 1999.
- TARR, R.I. *E. coli* O157:H7 outbreak in the western United States. **Dairy Food Environ. Sanit.**, Ames, v.13, n.10, p.592, 1993.
- TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on

microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.

TAYLOR, J.L., TUTTLE, J., PRAMUKUL, T., O'BRIEN, K., BARRETT, T.J., JOLBAITO, B., LIM, Y.L., VUGIA, D.J., MORRIS Jr., J.G., TAUXE, R.V., DWYER, D.M. An outbreak of cholera in Maryland associated with imported commercial frozen fresh coconut milk. **J. infect. Dis.**, Chicago, v.167, p.1330-1335, 1993.

THAYER, D.W., BOYD, G. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.4, p.1030-1034, 1993.


THAYER, D.W., RAJKOWSKI, K.T. Development in irradiation of fresh fruits and vegetables. **Food Technol.**, Chicago, v.53, n.11, p.62-65, 1999.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.1909-1823.

VAN BENEDEN, C.A., KEENE, W.E., WERKER, D.H., KING, A.S., CIESLALAK, P.R., HEDBERG, K., STRANG, R.A., BELL, A., FLEMING, D. A health food fights back: Abstract no. k47, 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, Washington D.C., 15 to 18 sept 1996. p.259. Apud: TAUXE, R., KRUSE, H., HEDBERG, C., POTTER, M., MADDEN, J., WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.11, p.1400-1408, 1997.

VAN DUYNHOVEN, Y.T., WIDDOWSON, M.A., DE JAGER, C.M., FERNANDES, T., NEPPELENBROEK, S., VAN DEN BRANDHOF, W., WANNET, W.J., VAN KOOIJ, J.A., RIETVELD, H.J., VAN PELT, W. Salmonella entérica serotype Enteritidis phage type 4b outbreak associated

- with bean sprouts. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.8, n.4, p.440-443, 2002.
- WATANABE, Y., OZASA, K., MERMIN, J.H., GRIFFIN, P.M., MASUDA, K., IMASHUKU, S., SAWADA, T. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.5, n.3, p.424-428, 1999.
- WATCHEL, M.R., CHARKOWSKI, A.O. Cross-contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.65, n.3, p.465-470, 2002.
- WATCHEL, M.R., WHITEHAND, L.C., MANDRELL, R.E. Association of *Escherichia coli* O157:H& with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.65, n.1, p.18-25, 2002.
- WEISSINGER, W.R., CHANTARAPANONT, W., BEUCHAR, L.R. Survival and growth of *Salmonella* bairdii in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.62, n.1/2, p.123-131, 2000.
- WELLS, J.G., DAVIS, B.R., WACHSMUTH, K.I., RILEY, L.W., REMIS, R.S., SOKOLOW, R., MORRIS, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.18, n.3, p.512-520, 1983.
- WILLSHAW, G.A., THIRLWELL, J., JONES, A.P., PERRY, S., SALMON, R.L., HICKEY, M. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhea, haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome in Britain. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.19, p.304-307, 1994.



YU, L.C., REITMEIER, C.A., LOVE, M.H. Strawberry texture and pectin content as affected by eletron beam irradiation. J. Food Sci., Chicago, n.61, p.844-846, 1996.

