

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

USO DE EXTRATOS DE TANINOS COMO SANITIZANTES EM ALFACE
MINIMAMENTE PROCESSADA

Tâmmila Venzke Klug
Engenheira de Alimentos/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida, e na minha trajetória acadêmica.

Agradeço os meus pais Ervino Klug e Elguita Venzke Klug e aos meus irmãos Jeferson Leandro Klug e Diego Venzke Klug por todo o apoio e amor incondicional em toda a minha trajetória.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Renar João Bender e ao meu co-orientador Prof. Dr. Alessandro Rios pela confiança e contribuição na minha formação. Meu muito obrigado pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, pelo carinho e principalmente pelo exemplo pessoal e profissional. Agradeço também a amizade e parceria nesses dois anos de mestrado.

Em especial, à Junia Capua, minha amiga, orientadora e parceira de todos os momentos, tua ajuda foi e sempre será um diferencial pra mim, meu muito obrigado por tudo.

As bolsistas Amanda Bianchini Moresco e Carolina Bonotto e à amiga Daniela Laranja obrigada por toda a ajuda nos experimentos, amizade e diversão. Obrigada gurias por tornar tudo mais divertido.

Agradeço as amigas Marília Milani e Fernanda Varela Nascimento e ao amigo Moisés Segaspini pela amizade sincera, pelo incentivo desde o início deste desafio, por toda a ajuda e parceria e por todos os momentos de diversão no laboratório de Pós Colheita.

Agradeço ao amigo Gustavo Klamer pela ajuda na estatística. A tua ajuda foi essencial, meu muito obrigado.

Ao amigo Matheus Moraes pelo apoio e ajuda com as traduções. Obrigada mesmo por tudo.

À Ana Raisal pela ajuda na execução dos experimentos.

À amiga Marisa Bello pela ajuda, amizade e incentivo em todos os momentos.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Compostos Bioativos, pela ajuda. Em especial aos amigos Carlos Pagno e Elis Regina pelo carinho e incentivo desde o início deste desafio.

Aos amigos que encontrei no Departamento de Horticultura: Daiane, Nicole, Sandra, Mateus, Sabrina, Cristiane, Marília e aos amigos Maria, Thaís, Dieisson, Adriano, Bruno Monte, Rafael, Camila, Caroline, Jaqueline, Bendik, Carlos, Ricardo, Bruno G., Jean, Jonas, Joel, Gabriel, agradeço pelos infinitos bons momentos, pelo incentivo e amizade, que sempre me motivaram para esta conquista. Obrigada família SNV por tornar tudo mais fácil!

Em especial agradeço aos amigos Tiago e Lucécia por todo o apoio, carinho e diversão, além das inúmeras histórias vividas.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, aos professores e funcionários que fizeram parte dessa trajetória.

O meu sincero obrigado, a todos que mesmo de longe, torceram por mim.

USO DE EXTRATOS DE TANINOS COMO SANITIZANTES EM ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA ¹

Autor: Tâmmila Venzke Klug
Orientador: Renar João Bender
Coorientador: Alessandro de Oliveira Rios

RESUMO

A sanitização com hipoclorito de sódio é recomendada para espécies hortícolas, porém há uma preocupação sobre uma possível formação a partir deste sanitizante de trihalometanos e ácidos haloacéticos, reconhecidos como compostos cancerígenos. Com base nisto, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito microbiológico e qualitativo de sanitizantes à base de extratos de taninos de *Acacia mearnsii* como uso alternativo ao hipoclorito de sódio em alface minimamente processada. Foram conduzidos dois experimentos. No primeiro trabalho definiram-se as concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos extratos de taninos SM®, SG® e AQ® contra a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25972. Além disso, foram feitas avaliações da redução de células de *E. coli* na superfície de folhas de alface após 2h e 24h de incubação, após o uso de extratos de taninos: SM® 1%, SG® 1% e AQ® 2% por 10 min, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L) por 15 min e água potável por 1 min. A visualização da presença de bactérias na superfície das folhas após os tratamentos de sanitização foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (mev). No segundo experimento, alface minimamente processada foi sanitizada com os extratos de taninos SM® 1% (10 min), SG® 1% (10 min), solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L / 15 min) e água potável (1 min) e armazenada a 3 ± 1°C por 9 dias. Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas, no dia da instalação do experimento (antes e após sanitização) e aos 5, 7 ou 9 dias. No primeiro experimento, as CMIs dos extratos de taninos SM® e SG® foram de 1% para *E. coli*, enquanto para o AQ® foi de 2%. Em relação à inoculação de *E. coli* na superfície de alface, os extratos SM® 1% e SG® 1% reduziram significativamente o número de células, comparável à eficácia de redução do hipoclorito de sódio, enquanto o extrato AQ® apresentou um menor efeito de redução não diferindo da redução obtida pelo uso de água. Após incubação de 24h observou-se formação de agregados celulares e foi possível visualizar células de *E. coli* no interior dos estômatos da folha de alface por mev. Os tratamentos SM® e SG® foram menos eficazes na redução de células de *E. coli* após incubação por 24h na comparação com a incubação por 2h, o que sugere que a internalização de bactérias no interior dos tecidos vegetais limitou a ação dos extratos de taninos. No segundo experimento, os melhores resultados microbiológicos e físico-químicos foram obtidos com o extrato tânico SM®, o qual não diferiu estatisticamente da solução de cloro. Os extratos de taninos reduziram significativamente a contagem microbiológica inicial das amostras de alface. Portanto, sugere-se o uso do extrato de tanino SM® na água de lavagem, com o objetivo de redução inicial da contagem microbiológica da alface.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (94p.) Abril, 2015.

APPLICATION OF TANNIN EXTRACTS AS SANITIZERS ON MINIMALLY PROCESSED LETTUCE¹

Author: Tâmmila Venzke Klug
Advisor: Renar João Bender
Co-Advisor: Alessandro de Oliveira Rios

ABSTRACT

Although sanitization with sodium hypochlorite is recommended for fresh cut vegetables, skepticisms remain concerning the possible formation of trihalomethanes and haloacetic acids, acknowledged carcinogenic compounds. Based on that, the present work intended to evaluate the microbiological and qualitative effects of sanitizers based on tannin extracts of *Acacia mearnsii* as an alternative to the use of sodium hypochlorite on fresh cut lettuce. Two experiments were conducted. In the first experiment, the minimal inhibitory concentrations (MIC) of the tannin extracts SM®, SG® and AQ® were defined against the *Escherichia coli* ATCC 25972. Furthermore, after a 2h or a 24h incubation period, the reduction of *E. coli* cells on the surface of lettuce leaves after the application of tannin extracts: SM® 1%, SG® 1% and AQ® 2% for 10 min, of solution of sodium hypochlorite (200 mg/L) for 15 min or water for 1 min was determined. Scanning electron microscopy (SEM) was performed after the sanitizing treatments. In the second experiment, fresh cut lettuce was sanitized with the tannin extracts SM® 1% (10 min) and SG® 1% (10 min), solution of sodium hypochlorite (200 mg/L / 15 min) and potable water (1 min) and stored at 3±1°C for 9 days. Microbiological and quality analyses were completed at day zero (before and after sanitization) and after 5, 7 or 9 days of cold storage. On the first experiment, the MIC of the SM® and SG® tannin extracts was 1% for *E. coli*, while the MIC of the AQ® was 2%. Regarding the inoculation of *E. coli* cells on the lettuce leaves surface, the SM® (1%) and SG® (1%) tannin extracts significantly reduced the number of cells comparable to the reducing efficacy of sodium hypochlorite. The AQ® extract presented the lowest reduction, which was not statistically different from the reduction obtained by using tap water. After the 24h incubation period, a formation of cellular aggregates was observed facilitating the visualization of *E. coli* cells in stomata of lettuce leaves by means of SEM. Moreover, the SM® and SG® treatments were less efficient in the reduction of *E. coli* cells after the 24h incubation compared with the 2h incubation, which suggests that the internalization of bacteria in the interior of plant tissues limited the action of the tannin extracts. On the second experiment, the results were obtained with the SM® tannin extract, not showing statistical difference from the chlorite solution. The tannin extracts significantly reduced the initial microbiological count of the lettuce samples. Therefore, the use of the tannin extract SM® is suggested for rinsing water, with the objective of an initial reduction of the microbiological count on lettuce leaves.

¹ Master of Science in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (94p.) April, 2015.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) | 4 |
| 2.2 Boas Práticas Agrícolas (BPA) | 5 |
| 2.3 Processamento mínimo e atributos de qualidade | 8 |
| 2.4 Patógenos alimentares | 10 |
| 2.5 Biofilmes microbianos | 13 |
| 2.6 Internalização bacteriana | 16 |
| 2.7 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e legislação | 18 |
| 2.8 Sanitização | 23 |
| 2.8.1 Sais de Hipoclorito..... | 24 |
| 2.8.2 Taninos..... | 27 |
| 2.9 Referências bibliográficas da Revisão bibliográfica | 31 |
| 3.1 Artigo 1 - Effect of tannin extracts on biofilms and attachment of <i>Escherichia coli</i> on leaf lettuce | 43 |
| 3.2 Artigo 2 - Effect of tannin extracts on quality of fresh cut crisp leaf lettuce | 65 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 91 |
| 5 CONCLUSÕES | 93 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Etapas da formação de biofilme: 1: Adesão bacteriana; 2: Formação microcolônias; 3: Maturação e dispersão. Fonte: Adaptado de Macedo & Abraham (2009)..... | 15 |
| 2. Representação esquemática estrutural de uma planta com internalização de bactérias. Fonte: Adaptado de Deering <i>et al.</i> , (2012)..... | 17 |
| 3. Número de Surtos e de doentes por DTA no Brasil entre 2000 e 2012. Fonte: Serviço de Vigilância em Saúde- SVS (2013)..... | 20 |
| 4. Proporção dos surtos de DTA por regiões do Brasil entre 2000 e 2013. Fonte: SVS, 2013..... | 21 |
| 5. Número de surtos por DTA por tipo de alimento no Brasil, entre 2000 e 2013. Fonte: SVS, 2013..... | 21 |
| 6. Distribuição do ácido hipocloroso e do íon hipoclorito em água em diferentes valores de pH e temperatura..... | 25 |
| 7. Principais monômeros da Acacia mearnsii. Fonte: Mangrich <i>et al.</i> , 2014..... | 28 |
| 8. Reação de obtenção do polímero orgânico catiônico via reação de Mannich. Fonte: Mangrich <i>et al.</i> , 2014..... | 29 |
| 9. Estrutura polimérica do Tanfloc. Fonte: Mangrich <i>et al.</i> , 2014..... | 29 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Valores médios da composição nutricional da alface crespa crua (100g)..... | 4 |
| 2. Revisão geral de cepas de <i>E.coli</i> enteropatogênicas..... | 12 |

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004) recomenda consumir pelo menos 400 gramas de produtos frescos por dia para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. Entretanto, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Pesquisa Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, 90% da população brasileira consome menos espécies olerícolas e frutíferas do que o recomendado, o que sinaliza um sério problema de saúde pública, já que aproximadamente 2,7 milhões de óbitos podem ser atribuídos a um baixo consumo de hortícolas (OPAS, 2003).

Entre os possíveis fatores do baixo consumo podemos citar a má qualidade dos produtos e preço elevado. No Brasil, ocorrem perdas de 30-40%, principalmente ocasionadas por fatores patogênicos, fisiológicos e físicos, que não são minimizados corretamente através da cadeia produtiva, gerando impactos econômicos e ambientais significativos para o país (ANDRADE *et al.*, 2008).

Produtos minimamente processados surgem como um promissor mercado que possibilita reduzir algumas perdas pós-colheita, além de agregar valor ao produto final. De acordo com a *International Fresh Cut Producers Association* (IFPA, 2015) produtos minimamente processados são frutas ou hortaliças modificadas fisicamente, mas que mantém o seu estado fresco. Esses produtos, além de aliar praticidade, variedade e qualidade são a base para uma alimentação nutricionalmente equilibrada e promotora de um sistema alimentar sustentável.

A alface (*Lactuca sativa*) é considerada um componente imprescindível nas saladas dos brasileiros (FERNANDES, 2002) e, atualmente, é uma das hortaliças mais utilizadas em processamento mínimo.

O processamento mínimo inclui as atividades de seleção e classificação da matéria-prima, pré-lavagem, processamento (corte, fatiamento), sanificação, enxágue, centrifugação e embalagem. Através destes procedimentos se objetiva a obtenção de um produto fresco e saudável e que, na maioria das vezes, não necessite subsequente preparo para ser consumido (ARTÉS & ALLENDE, 2005; MORETTI, 2007). Nesse processo, as espécies hortícolas podem sofrer alterações decorrentes de ação enzimática e microbiológica que afetam o valor nutricional e a vida de prateleira dos produtos (ARTÉS *et al.*, 1998). Em adição, a negligência das práticas sanitárias durante o processamento pode contribuir para a veiculação de microorganismos deterioradores e patogênicos, aumentando o risco de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (ARTÉS *et al.*, 1998).

Vegetais frescos, especialmente o alface, foram identificados como veículos de bactérias patogênicas relevantes para a saúde pública. *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *E. coli* enterotoxigênica e *E. coli* enterohemorrágica (por exemplo, *E. coli* O157:H7) já foram determinadas em alfaves de sistemas comerciais de produção (EFSA, 2013). Além disso, estima-se que anualmente cerca de um terço da população dos países desenvolvidos seja afetado por doenças de origem alimentar. Em países em desenvolvimento, as DTAs levam ao óbito anualmente cerca de 2,2 milhões de pessoas, sendo a maioria crianças (FAO, 2006). Portanto, a segurança e a qualidade microbiológica desses produtos devem ser garantidas diante da correta aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) na cadeia produtiva.

A lavagem em água corrente de boa qualidade pode reduzir a carga microbiana dos vegetais. No entanto, a água não é suficiente para manter a contaminação em níveis seguros. É essencial a inserção de uma etapa de sanitização com agentes antimicrobianos (NASCIMENTO *et al.*, 2010). A prática de sanitização é uma etapa importante das Boas Práticas de Produção (BPP) para reduzir a níveis seguros a presença de microorganismos patogênicos no alimento (NASCIMENTO *et al.*, 2002). Em espécies hortícolas este processo é considerado uma etapa crítica para garantir a segurança no consumo (SANTOS, 2007).

A sanitização com produtos que tenham cloro em sua formulação é recomendada para reduzir a contagem microbiológica inicial em hortícolas

minimamente processados. Há, todavia, uma preocupação sobre a possível formação de trihalometanos e ácidos haloacéticos, compostos cancerígenos, a partir desse sanitizante (HUA & RECKHOW, 2007). Em muitos países europeus o uso hipoclorito de sódio é proibido por meio de legislações rígidas (ARTES & ALLENDE, 2005, ARTES *et al.*, 2009 ; RICO *et al.*, 2007) e a tendência é que essa restrição aconteça em outras regiões, o que implica a busca de sanitizantes alternativos para a substituição dos compostos clorados.

Recentemente, há um grande interesse no estudo de agentes de higienização e/ou métodos mais eficazes que proporcionem baixos custos de energia, apresentem custo competitivo, sejam favoráveis ao meio ambiente, além de garantir a segurança microbiológica, qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (São José *et al.*, 2014). Assim, novas tendências em segurança alimentar e saneamento por meio do uso de aditivos naturais estão sendo estimuladas principalmente pelas preocupações atuais de segurança alimentar, evidenciadas por problemas de resistência microbiana e pelo aumento na produção de alimentos processados. Além do incremento de políticas verdes por indústrias alimentícias. (ZHANG *et al.*, 2007; TRIPATHI & SHUKLA, 2007).

Nesse contexto, taninos surgem como substâncias naturais de relevância devido às suas propriedades biológicas e fisiológicas. (CHUNG *et al.*, 2008). Diversos estudos apresentam a atividade bacteriostática *em vitro* de extratos tânicos contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus* (NABI *et al.*, 1992 ; ARIAS *et al.*, 2004 ; VORAVUTHIKUNCHAI *et al.*, 2004; HERNANDEZ *et al.*, 2009), fornecendo uma base científica que pode justificar o uso de extratos tânicos como sanitizantes em alimentos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito microbiológico e qualitativo de sanitizantes a base de extratos de taninos de *Acacia mearnsii* em alface minimamente processada, como também o uso alternativo do hipoclorito de sódio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma espécie originária da Europa e da Ásia e pertence à família Asteraceae. Pertencem ainda a esta família botânica espécies como a alcachofra, o almeirão e a chicória ou escarola (MELO *et al.*, 2012).

A alface fornece inúmeros benefícios ao organismo, tais como o desenvolvimento e a regulação orgânica do corpo (MARTINS *et al.*, 2008). Além disso, as folhas de alface são uma fonte de fibra alimentar, substância funcional, que possui efeito de diminuir os níveis de colesterol sanguíneo e os riscos de desenvolvimento de câncer (ANJO, 2004; TACO, 2011).

TABELA 1. Valores médios da composição nutricional da alface crespa crua (100g)

| Composição Nutricional | Valor |
|------------------------|---------|
| Energia | 11 kcal |
| Proteína | 1,3 g |
| Lipídeos (g) | 0,2 |
| Carboidrato (g) | 1,7 |
| Fibra Alimentar (g) | 1,8 |
| Umidade (%) | 96,1 |
| mg Ca | 38 |
| mg Mg | 11 |
| mg Fe | 0,4 |
| mg P | 26 |
| mg K | 267 |
| Vit C (mg) | 15,6 |

Kcal = Kilocaloria ; g = grama; mg = miligrama; Fonte: TACO (2011)

O vegetal possui cor, aroma, textura e sabor de agradável paladar, tornando-se assim, a hortaliça mais consumida no Brasil e no mundo (HENZ & SUINAGA, 2009). Destaca-se pelo consumo *in natura* em saladas, tanto para uso doméstico como comercial (MORETTI & MATTOS, 2006).

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008/2009 do IBGE, o consumo médio per capita de alface no Brasil é de 3,6 g/dia. Quando se compara o consumo médio per capita das diferentes regiões observa-se que a Região Sul apresenta o maior consumo (9,2 g/dia), Região Centro Oeste (4,6 g/dia), seguida da Região Sudeste (3,8 g/dia).

Segundo dados da CEASA/RS (2015) o volume de alface disponibilizada para comercialização entre 2011 e 2013 foi de aproximadamente 20.269,28 toneladas com média mensal de 6.756,43 toneladas neste período. A comercialização de alface na CEASA/RS representa aproximadamente 35% de todas as espécies hortícolas consumidas no Rio Grande do Sul.

2.2 Boas Práticas Agrícolas (BPA)

Segundo Sigrist (1998) a qualidade dos produtos hortícolas é originada no campo, portanto, os cuidados no setor produtivo tornam-se imprescindíveis onde a aplicação de Boas Práticas Agrícolas (BPA) é essencial para a obtenção de um produto minimamente processado seguro e de qualidade.

Um dos aspectos que devem ser observados no plantio visando segurança microbiológica tem relação com as potenciais fontes de contaminação na produção de produtos hortícolas, tais como a água de irrigação, água de lavagem, solo e adubos (HOLVOET *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014). Por influenciar o grau de contaminação química e microbiológica da matéria-prima, o uso de esterco, lodo de esgoto ou de fertilizantes naturais sem a realização de compostagem ou fermentação deve ser uma preocupação preliminar. De forma geral, aconselha-se que os adubos orgânicos sejam compostados por no mínimo 90 dias (EMBRAPA, 2003) para que patógenos como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* possam ser eliminados, o que diminui o risco de contaminação (RODRIGUES *et al.*, 2014).

O respeito ao “ponto de colheita” e retirada de hortaliças impróprias para o consumo humano já no campo; a limpeza e sanitização das folhas de alface e caixas de coleta para o transporte, bem como as condições de higiene do ambiente de produção; armazenamento refrigerado e sanitização de todos os equipamentos e utensílios utilizados na produção devem ser também observados para manter os níveis iniciais de contaminação microbiológica em valores aceitáveis (MORETTI, 2003).

Em relação à contaminação química de produtos hortícolas, o uso indiscriminado de agrotóxicos sem obediência ao período de carência pode resultar em resíduos químicos superiores aos limites permitidos por legislação ocasionando danos à saúde do consumidor (MORETTI, 2003). Já em relação às características sensoriais de produtos hortícolas, como alface, o ponto de colheita e seleção das plantas deve ser feitos a campo de acordo com parâmetros de aparência, tamanho e firmeza. O ponto de colheita indicado corresponde ao máximo desenvolvimento da planta estando as folhas ainda tenras e sem indícios de pendoamento. A colheita deve ser realizada nas primeiras horas do dia ou ao final da tarde por ser uma folhosa muito suscetível à perda de água (HENZ *et al.*, 2008). Caso este ponto máximo de colheita não seja respeitado, os fotoassimilados (compostos resultantes da fotossíntese) poderão ser drenados para o caule formando uma seiva de sabor amargo. Além disso, a maturação excessiva aumenta a taxa de respiração da planta aumentando a suscetibilidade a distúrbios fisiológicos e podridões (CHITARRA & CHITARRA, 2007).

Durante a compra de hortaliças folhosas o consumidor faz uma avaliação da qualidade do produto por sua aparência em que a cor, frescor e ausência de defeitos são parâmetros importantes. Goto (2010) indica que 70% da decisão de compra de produtos como frutas e hortaliças se baseia na aparência. Portanto, operações de transporte e armazenamento adequadas são de extrema importância para a qualidade e vida de prateleira do produto. Além disso, técnicas inadequadas de manuseio do vegetal após a colheita originam perdas econômicas elevando os preços de venda e penalizando produtores e consumidores.

Estima-se que 30% a 40% das perdas na produção de hortaliças ocorram na fase de pós-colheita (ANDRADE *et al.*, 2008). Pesquisa realizada na CEAGESP

indicou que 19% das perdas na alface são causadas pela embalagem inadequada, 17% tem origem no transporte e 10% resultam do manuseio inadequado (CEAGESP, 2012).

As superfícies das embalagens utilizadas para hortaliças devem ser lisas ou recobertas com algum material que reduza a fricção do produto com as paredes internas da embalagem. Além disso, devem estar limpas e sem fontes de inóculos de doenças, evitando, assim, injúrias mecânicas que depreciam o valor alimentar e comercial do produto na forma de lesões, amassamentos e injúrias internas, também evitando contaminações que possam penetrar no produto, ocasionando o seu apodrecimento (CALBO *et al.*, 2011). De acordo com a Instrução Normativa Conjunta número 9, de 12 de novembro de 2002, da ANVISA, as embalagens mais indicadas são caixas de plástico grande, vazadas, de fácil higienização, paletizáveis e de grande durabilidade (BRASIL, 2002).

De acordo com Calbo *et al.* (2011), o emprego de pré-resfriamento com a finalidade de remoção imediata da “energia/calor de campo” propicia um aumento de mais de um dia na vida útil de alfaces. Esta operação deve ser realizada imediatamente após a colheita da alface. Após a remoção desta energia as hortícolas devem ser armazenadas sob refrigeração e umidade controlada, visando o aumento da vida útil dos produtos, manutenção das características sensoriais e nutricionais e redução da multiplicação microbiana. A umidade relativa durante o armazenamento de alfaces deve ser superior a 95% (CALBO *et al.*, 2011) e a temperatura recomendada é de 1 °C a 2 °C (FONSECA *et al.*, 2009).

A utilização da cadeia de frio na produção de hortaliças deve ser ininterrupta até o consumo, isto é, o produto deve ser pré-resfriado, refrigerado, armazenado, transportado e comercializado sob refrigeração e umidade relativa controlada, evitando danos causados por condensação de água ou aumentos abruptos de temperatura. A elevação da temperatura acelera a velocidade das reações bioquímicas e a reprodução de microrganismos, o que resulta em murchamento e deteriorização do produto. A umidade relativa abaixo da recomendada gera aumento de transpiração, ocorrendo murchamento e perda de coloração e qualidade visual do produto. A condição ideal para o transporte é o acondicionamento em associação com refrigeração, porém algumas recomendações tais como, transportar as

hortaliças nas horas mais frescas do dia e da noite, adequar espaçamento entre caixas para ventilação e redução do acúmulo de calor e gases e distribuir o peso da carga equitativamente são importantes para a garantia da qualidade (CALBO *et al.*, 2011).

2.3 Processamento mínimo e atributos de qualidade

De acordo com a *International Fresh Cut Producers Association* (IFPA, 2015), produtos minimamente processados são frutas ou hortaliças modificadas fisicamente, mas que mantém o seu estado fresco. O processamento mínimo objetiva suprir as necessidades dos consumidores disponibilizando produtos de qualidade sensorial e nutricional, seguros, convenientes e adequados para o consumo. Consequentemente ocorre a agregação de valor aos produtos, maior aproveitamento da produção, redução das perdas pós-colheita e maior eficiência no manejo de resíduos (MATTIUZ *et al.*, 2004).

Hortícolas minimamente processadas possuem crescente aceitação dos consumidores, particularmente nos grandes centros urbanos, pois se alinham com as características da sociedade moderna: urbanização, maior número de pessoas morando sozinhas e crescente participação feminina no mercado de trabalho. Com isso, esses produtos destinam-se a um nicho de mercado em crescimento, visando atender um perfil específico de consumidor mais consciente e exigente (CENCI, 2011).

O principal impacto do processamento mínimo consiste no melhor aproveitamento da produção, permitindo que micro e pequenas empresas familiares possam agregar valor aos seus produtos hortícolas e propiciar o aumento da sua renda (DURIGAN, 2000). Com um melhor preço de venda desses produtos há uma melhora na competitividade do setor de horticultura, proporcionando novos canais de comercialização e escoamento de produção, visando impactos econômicos e sociais pela redução das perdas, pela geração de empregos diretos e indiretos e pelo aumento de renda dos produtores (CENCI, 2011).

Nos Estados Unidos, a comercialização de produtos minimamente processados ocorre desde 1970, mas no Brasil, esses produtos tornaram-se

comercialmente disponíveis só nas duas últimas décadas. Atualmente, é um mercado em expansão no qual grandes cadeias de supermercados são responsáveis por 10 a 13% do total de vendas (OLIVEIRA *et al.*, 2011), ainda que seja um mercado com grandes limitações.

De acordo com SEBRAE (2008), as principais limitações dos produtos minimamente processados são custo mais elevado, maior perecibilidade em relação ao produto *in natura*, falta de fornecedores com a opção de produtos variados e de boa qualidade e a desconfiança de parte dos consumidores em relação à qualidade microbiológica. O consumidor pode compensar o maior custo dos produtos com a redução do desperdício e o aumento do aproveitamento do vegetal comprado.

As etapas de obtenção de hortaliças minimamente processadas envolvem operações de seleção e classificação da matéria-prima. Na seleção deve ocorrer a retirada das folhas externas de forma manual. Em seguida, o produto é encaminhado para as etapas de processamento, em área limpa, onde ocorre pré-lavagem, corte, sanitização, enxágue, centrifugação, acondicionamento e armazenamento (MORETTI, 2004).

De acordo com Saabor e Rojo (2002) a higiene (53%), praticidade (52%), boa aparência (41%) e qualidade (38%) são as principais razões que levam os consumidores a escolher produtos embalados, o que inclui os minimamente processados. Portanto, atributos como sabor, aroma e valor nutritivo não podem ser perdidos durante o processamento. Ademais, é importante observar outro critério, menos visível: a segurança no que concerne à contaminação física, química e biológica.

Requisitos como a implementação das BPF e de um programa de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são importantes para prevenir e controlar os riscos da contaminação microbiana e manter a qualidade do produto (CHITARRA, 2000). A contaminação de produtos minimamente processados por microrganismos patogênicos tem relação direta com a contaminação microbiológica inicial da matéria-prima. Durante o processamento, a falta de higiene de manipuladores, equipamentos, ambiente e a realização de uma sanitização inadequada são os principais problemas relacionados com contaminação microbiológica.

Outros fatores importantes na manutenção da qualidade dos produtos minimamente processados são a temperatura e a embalagem com atmosfera modificada. Ambos podem ter interferência na atividade fisiológica de espécies hortícolas e compreendem as atividades metabólicas, respiratórias e enzimáticas. O controle de temperatura na cadeia do processamento mínimo é essencial, visto que a perda de qualidade destes produtos tem relação direta com a respiração da espécie em processamento. A temperatura afeta de forma significativa a taxa de respiração, a transpiração, a produção de etileno e a atividade enzimática (CHITARRA, 2000).

Já no armazenamento do produto sob atmosfera modificada, o equilíbrio é adquirido no interior da embalagem com concentrações ótimas de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) que podem contribuir para o aumento da vida útil do vegetal processado (CHITARRA, 2000).

Níveis baixos de O₂ reduzem a produção de etileno nos tecidos vegetais e níveis adequados de CO₂, conforme a espécie hortícola, inibem tanto a síntese quanto a ação do etileno. Níveis adequados de CO₂ na atmosfera de armazenagem podem igualmente reduzir as injúrias causadas na armazenagem em baixas temperaturas assim como pode reduzir o ataque de patógenos ao produto (CENCI, 2011). O alcance do equilíbrio entre o O₂ e o CO₂ na atmosfera de armazenagem irá depender da taxa respiratória intrínseca do produto, da taxa de permeabilidade a gases da embalagem que regula a entrada de O₂ e a saída do CO₂ pelo material da embalagem, além de fatores externos como temperatura, umidade relativa, peso de enchimento, entre outros.

2.4 Patógenos alimentares

Foram identificados em espécies hortícolas bactérias patogênicas de relevância como *Salmonella spp*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.*, *Bacillus cereus* (WHO, 1998; SILVA *et al.*, 2006).

Bactérias *E. coli* spp. são gram-negativa, oxidase negativa, apresentam formato de bastonete, com multiplicação em condições aeróbicas e anaeróbicas, de preferência à 37 °C (CROXEN *et al.*, 2013). Cepas patogênicas de *E.coli* spp.

podem contaminar alimentos crus por meio de contaminação fecal direta ou indireta. A contaminação direta pode ocorrer durante o processamento, por exemplo, devido à falta de higiene pessoal dos manipuladores. Já a contaminação indireta pode ser resultado da incursão de animais nas áreas de cultivo, utilização de água irrigação ou água contaminada de processamento e solo contaminado por fezes na área do plantio.

Cepas patogênicas de *E. coli* podem estar presentes no trato intestinal dos humanos e dos animais de sangue quente, e podem causar inúmeras doenças em humanos que se estendem do trato gastrointestinal para o trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central (KAPER *et al.*, 2004; CROXEN & FINLAY, 2010). As cepas que produzem gastroenterites em crianças, adultos e animais são denominadas enteropatogênicas, podendo-se distinguir categorias: enteropatogênica clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), facultativamente enteropatogênica (FEEC), enteroagregativa (EA_gEC), difusivamente aderente (DAEC), baseado nos fatores de epidemiologia, virulência e manifestações clínicas (CROXEN *et al.*, 2013)

A Tabela 2 apresenta uma revisão geral de cepas de *E coli* enteropatogênicas. A dose mínima infectante da *E. coli* pode variar de 10 a 10000 células por grama ou mililitro de produto consumido, dependendo do sorotipo envolvido (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000).

TABELA 2. Revisão geral de cepas de *E.coli* enteropatogênicas

| Sorotipo | Hospedeiro | Local de colonização | Sintomas | Reservatório conhecido/ Fonte(s) contaminação | Tratamento |
|-----------------|--|------------------------------|--|---|---|
| EPEC | Crianças < 5 anos | Intestino delgado | Diarréia aquosa profunda | Humanos, animais | Hidratação, antibiótico em casos persistentes |
| EHEC | Adultos, crianças | colón | Diarréia aquosa, colite hemorrágica, HUS | Humanos, animais, alimentos e água | Hidratação, tratamento de HUS |
| EIEC / Shigella | Crianças <5 anos, adultos, viajantes, imunocomprometidos | cólon | shigellosis / disenteria bacilar, potencial HUS | Humanos, animais, alimentos e água | Hidratação, antibiótico |
| EAEC | Adultos, crianças | Intestino delgado e/ou cólon | Diarréia viajante, diarreia persistente | Alimentos | Hidratação, antibiótico |
| ETEC | Imunocomprometidos, viajantes, crianças <5 anos | Intestino delgado | Diarréia aquosa, persistente | Humanos, animais, alimentos e água | Hidratação, antibiótico |
| DAEC | Crianças (18 meses até 5 anos), adultos | intestino | Diarréia persistente em crianças, Doença de Crohn em adultos | Não conhecida | Antibiótico, hidratação |
| AIEC | Adultos, crianças | Intestino delgado | Dores abdominais, diarréia, febre (Doença de Crohn) | Não conhecida | Antibiótico |

Fonte: Adaptado de Croxen *et al* (2013).

2.5 Biofilmes microbianos

A primeira observação de um biofilme feita pelo homem foi em 1675, quando Antonie van Leeuwenhoek descreveu a ocorrência do que ele chamou de “pequenos animais” em seu dente. Entretanto, a teoria geral de biofilmes foi publicada apenas em 1978 (COSTERTON *et al.*, 1978). A partir desta publicação, estudos para a compreensão da estrutura e desenvolvimento de biofilmes, estão sendo relatados (BATTIN *et al.*, 2007).

Biofilme pode ser definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas no interior de uma matrix de exopolissacarídeos (EPS) produzidas pelas próprias células aderidas em uma superfície abiótica ou biótica (COSTERTON *et al.* 1999). A formação de biofilme é muito favorável para as bactérias devido à proteção a diversas condições como exposição à luz ultravioleta, à ácidos, à desidratação, à salinidade, à fagocitose e a vários antimicrobianos (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

A formação de biofilmes ainda não é claramente definida, mas acredita-se que cinco etapas estejam envolvidas nessa formação. As etapas são as seguintes: (i) Etapa reversível de fixação à superfícies, (ii) Fixação irreversível através da produção de *quorum sensing* e EPS (iii) Formação Microcolônias, (iv) Maturação e, (v) Dispersão (JAHID & HA, 2012) ilustradas pela Figura 1.

Na etapa reversível de fixação à superfícies, o microrganismo está fracamente aderido à superfície através de forças de van der Waals e atrações eletrostáticas, o que facilita a remoção das células bacterianas. Essa reversível fixação dependerá das condições patogênicas e nutricionais das plantas, da hidrofobicidade, da superfície celular da planta, se a planta possui ferimentos e até mesmo de interações entre bactérias presentes na superfície (UKUKU & FETT; 2002). As folhas da maioria das plantas possuem cutina, suberina e ceras, aumentam a hidrofobicidade superficial e adesão microbiana (JAHID & HA, 2012).

A fase de fixação irreversível ocorre através da produção de *quorum sensing* e EPS. Nessa fase, quando as bactérias se agregam e fixam-se à superfícies, expressam tipos particulares de moléculas (sistema *quorum sensing* – QS), para comunicação e coordenação (SPERANDIO *et al.*, 2003). O QS é o sistema de sinalização célula-célula microbiano que correlaciona à expressão gênica com a densidade populacional. Assim, conforme a densidade bacteriana, as células

sintetizam sinais moleculares, detectam esses sinais, e por meio de interações moleculares específicas ativam ou inativam genes alvo (PAN & REN, 2009). O QS é responsável pelas comunicações intra e interespecíficas, controlando um grande espectro de fenótipos, incluindo a formação e a virulência do biofilme, bem como a produção de EPS (HENSE *et al.*, 2007). Nessa etapa também ocorre a formação de EPS. A matriz do biofilme (EPS) é um meio complexo composto essencialmente de água, mas também inclui polímeros exopolissacarídeo, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, fosfolipídeos / nutrientes absorvidos, e metabólitos (GHANNOUM & O'TOOLE, 2001). O EPS é formado sobre agregados bacterianos, protegendo-os de estresses, tais como antibióticos, desinfetantes e irradiação natural (STEWART *et al.*, 2000), além de oferecer proteção a bactérias epífitas encontradas na superfície celular de plantas (MORRIS *et al.*, 1997).

Após fixação a superfícies, ocorre a etapa de formação de microcolônias, onde as bactérias se multiplicam e começam a se comunicar umas com as outras, formando moléculas QS. Após certo nível de formação de moléculas QS, estímulos ambientais auxiliam a formação de EPS e a multiplicação celular no interior de EPS, bem como a formação de microcolônias, que consistem de multi-espécies bacterianas, com aporte de nutrientes (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

Uma vez que as condições são favoráveis, a fase final de formação do biofilme é a maturação, em que os biofilmes desenvolvem uma estrutura auto organizada dentro de um microambiente. Os biofilmes maduros consistem de bactérias não-móveis cercadas por EPS, que têm canais de nutrientes e fluxo de água (STOODLEY *et al.*, 1994).

Por fim, a fase de dispersão ocorre a partir da desagregação dos biofilmes microbianos que pode ocorrer devido a várias razões, tais como falta de acessibilidade a nutrientes, mudanças na superfície e como também por forças físicas da superfície (KAPLAN, 2010). Algumas superfícies de plantas possuem camadas de cutícula hidrofóbicas, que desempenham um importante papel na fixação, na formação de EPS, bem como no ataque de bactérias na superfície das folhas. Enzimas produzidas por bactérias durante a sua multiplicação, influências ambientais e interação humana podem ser razões para a dispersão do biofilme bacteriano. (MAI-PROCHNOW *et al.*, 2006; HUNT *et al.*, 2004).

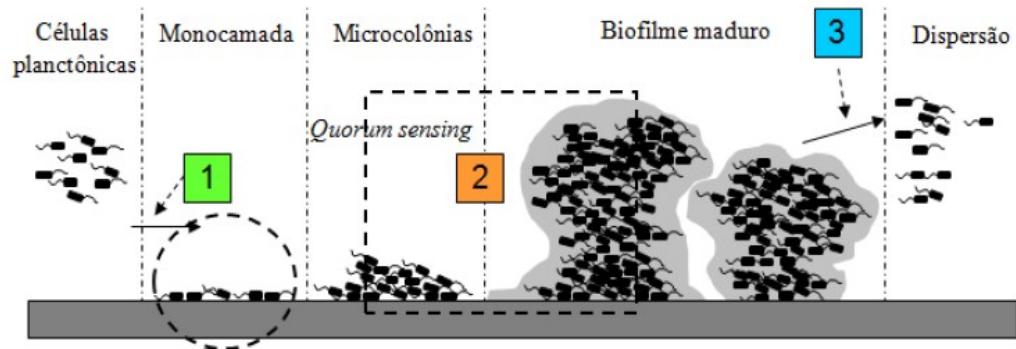


FIGURA 1. Etapas da formação de biofilme: 1: Adesão bacteriana; 2: Formação microcolônias; 3: Maturação e dispersão. Fonte: Adaptado de Macedo & Abraham (2009).

Três fatores têm sido propostos para explicar a alta resistência dos biofilmes. O primeiro tem relação com as propriedades da matriz. A matriz apresenta inúmeras funções como adesão e agregação de células; retenção de água, o que mantém o microambiente hidratado; barreira de proteção; absorção de compostos orgânicos e inorgânicos e troca de informação genética. (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

O segundo fator refere-se à heterogeneidade fisiológica no biofilme. Os organismos constituintes do biofilme formam populações heterogêneas com diferentes níveis de atividade, relacionado ao gradiente de concentração de oxigênio, nutrientes e resíduos. Assim, mesmo que o agente antimicrobiano penetre na EPS, algumas células dentro do biofilme permanecem protegidas em razão da sua baixa taxa metabólica (células dormentes) (STEWART & FRANKLIN, 2008).

O terceiro fator são as subpopulações resistentes (persistentes). Os biofilmes geram células persistentes numa taxa até 10.000 vezes mais alta que as células planctônicas. Essas células são especializadas em mediar a tolerância a diversas drogas, sendo representadas por aproximadamente 0,1 a 10% da população total do biofilme (HARRISON *et al.*, 2007). Além disso, o biofilme é resistente à ação de sanitizantes. Robins *et al.* (2005) afirmam que é necessário um aumento de 16x na concentração do sanitizante para destruir biofilmes celulares em comparação à eliminação de células planctônicas.

2.6 Internalização bacteriana

Estudos demonstram que bactérias patogênicas podem ser introduzidas e, possivelmente, se internalizam dentro de produtos frescos nas fases de pré e pós-colheita, principalmente por meio de sementes, solo e/ou água de irrigação (MOOTIAN *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2009; JABLASONNE *et al.*, 2005; FRANZ *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2008). A internalização é afetada por uma série de fatores, como o tipo e a idade da planta, o tipo de estirpe e/ou sorotipo de bactéria, a via de contaminação, entre outros (DEERING *et al.*, 2012).

Patógenos alimentares são capazes de se internalizar dentro de uma variedade de tecidos e órgãos de plantas, tais como em tecido vascular ou no apoplasto de alfaces e espinafres (NIEMIRA, 2007), na cavidade sub-estomática de alface (KROUPITSKI *et al.*, 2009), nas raízes, no hipocótilo e cotilédones de brotos de alfafa (GANDHI, 2001); em folhas de coentro (BRANDL, 2002); no xilema e hipocótilo de rabanetes (ITOH *et al.*, 1998); na área de transição das raízes para a parte aérea de alfaces (KLERKS *et al.*, 2007). A Figura 2 abaixo demonstra uma representação esquemática da estrutura de uma planta evidenciando os tecidos nos quais bactérias já foram detectadas.

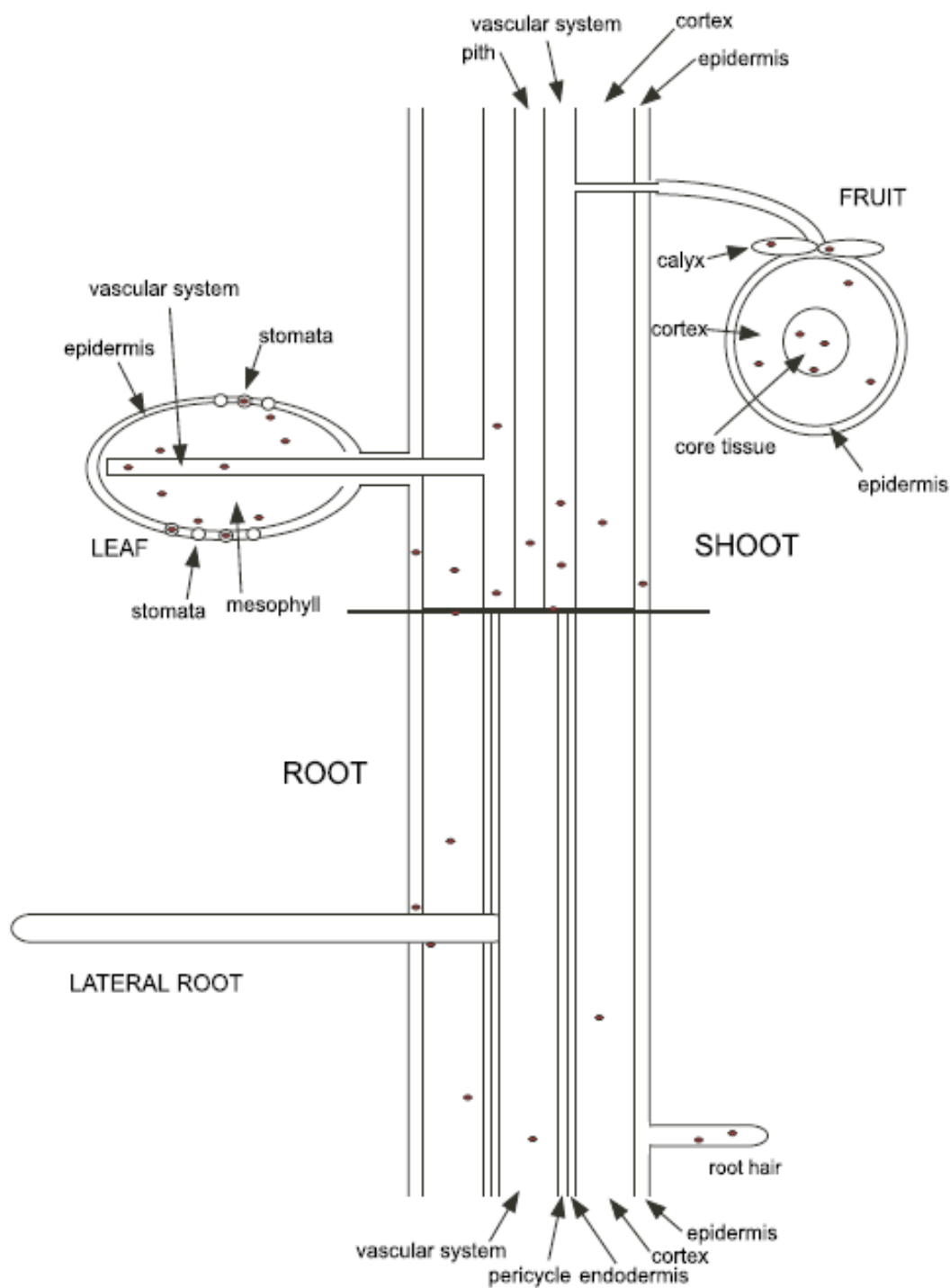


FIGURA 2. Representação esquemática estrutural de uma planta com internalização de bactérias. Fonte: Adaptado de Deering *et al.*, (2012).

De acordo com Deering *et al.* (2012), há a possibilidade de duas entradas bacterianas nas plantas. A primeira possibilidade é a entrada de bactérias através de aberturas naturais na superfície da planta como, por exemplo: estômatos, lenticelas

ou, raízes laterais ou através de rupturas no tecido vegetal ocasionados por danos físicos ou biológicos. As bactérias se deslocam para o interior do tecido vegetal por meio da água utilizada na semeadura das sementes, por irrigação para produção ou por enxague do material colhido.

Inúmeros estudos indicaram que *Salmonella* spp. e *E. coli* são capazes de se multiplicar sobre ou dentro da planta (COOLEY *et al.*, 2003; DEERING *et al.*, 2011; JABLASON *et al.*, 2005; SCHIKORA *et al.*, 2008; WARRINER *et al.*, 2003), e diversos fatores podem influenciar a extensão da internalização (DEERING *et al.*, 2012). A internalização de *E. coli* O157: H7 em folhas de alface foi reportada após aspersão (8 log UFC/mL) na face abaxial (superior) das folhas, sendo detectada até 14 dias após a inoculação (ERICKSON *et al.*, 2010a).

Patógenos humanos são capazes de explorar a planta nutricionalmente, e a literatura relata alguns possíveis mecanismos de obtenção de nutrientes. As bactérias que vivem no espaço apoplástico de plantas podem ser capazes de utilizar diretamente os polissacarídeos da parede celular da planta, por meio de enzimas que permitem a hidrólise de macromoléculas em açúcares disponíveis. Yoo *et al.*, (2004) identificaram um gene em *Salmonella* spp. que codifica uma dessas enzimas.

Uma segunda possibilidade de internalização de bactérias nos tecidos é a capacidade de patógenos humanos colonizarem plantas que pode ser influenciada por suas interações positivas ou negativas com outras bactérias. Interações positivas podem ser devido à presença de outras bactérias ou fungos que produzem fonte de carbono disponível (via de degradação de polímeros da parede celular ou secreção induzida de açúcares), que de outra forma seria inacessível aos patógenos humanos. Alternativamente, patógenos de plantas que causam fermento ou destruição dos tecidos vivos podem criar um microambiente que é mais favorável para a sobrevivência e/ou multiplicação de patógenos como *Salmonella* sp. e *E. coli* O157:H7 (DEERING *et al.*, 2012).

2.7 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e legislação

Estima-se que anualmente cerca de um terço da população dos países desenvolvidos seja afetada por doenças de origem alimentar. Em países em

desenvolvimento, as DTA levam à óbito anualmente cerca de 2,2 milhões de pessoas, a maioria crianças (FAO, 2006).

Entre 1996 e 2006, um total de 98, 40, 33, 25, 25, e 24 surtos alimentares foram relatados devido a vegetais frescos e condimentos nos Estados Unidos, Finlândia, Polônia, Canadá, Austrália e Brasil, respectivamente (FAO, 2008).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimou nos Estados Unidos em 2011, que ocorrem anualmente cerca de 48 milhões de casos de DTAs, com conseqüente 320 000 hospitalizações e 3000 mortes (SCALLAN *et al.*, 2011). Em pesquisa realizada com base em 1565 surtos de DTAs em 2003-2008, nos EUA, os alimentos aves, olerícolas folhosas, carne bovina e produtos lácteos foram responsáveis por mais da metade das doenças associadas ao surto (CDC, 2013).

No Brasil, no período de 1999 a 2008, um total de 6062 surtos alimentares foram reportados, onde 144 estavam relacionados ao consumo de vegetais. (SVS, 2010). E de acordo com pesquisa realizada pela Secretaria de Vigilância em Saúde (2013) os principais microrganismos causadores de DTA no Brasil são a *Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. coli*. Os locais de ocorrência mais frequente dos surtos alimentares são as residências, seguidos de creche/escola e restaurante/ padarias. A Figura 3 apresenta o número de surtos e doentes por DTA no Brasil no período de 2000 a 2012 (SVS, 2013) e a Figura 4 a proporção de surtos e de DTA no Brasil no período de 2000 a 2013 (SVS, 2013). A região Sul é a nº 1 em notificações da ocorrência de DTA (38,9%), o que não demonstra que ocorrem mais DTA nesta região e sim, muito provavelmente, um maior número de notificações. A Figura 5 indica o número de surtos de DTA por alimento associadas a hortaliças, onde houve um total de 110 surtos em 13 anos.

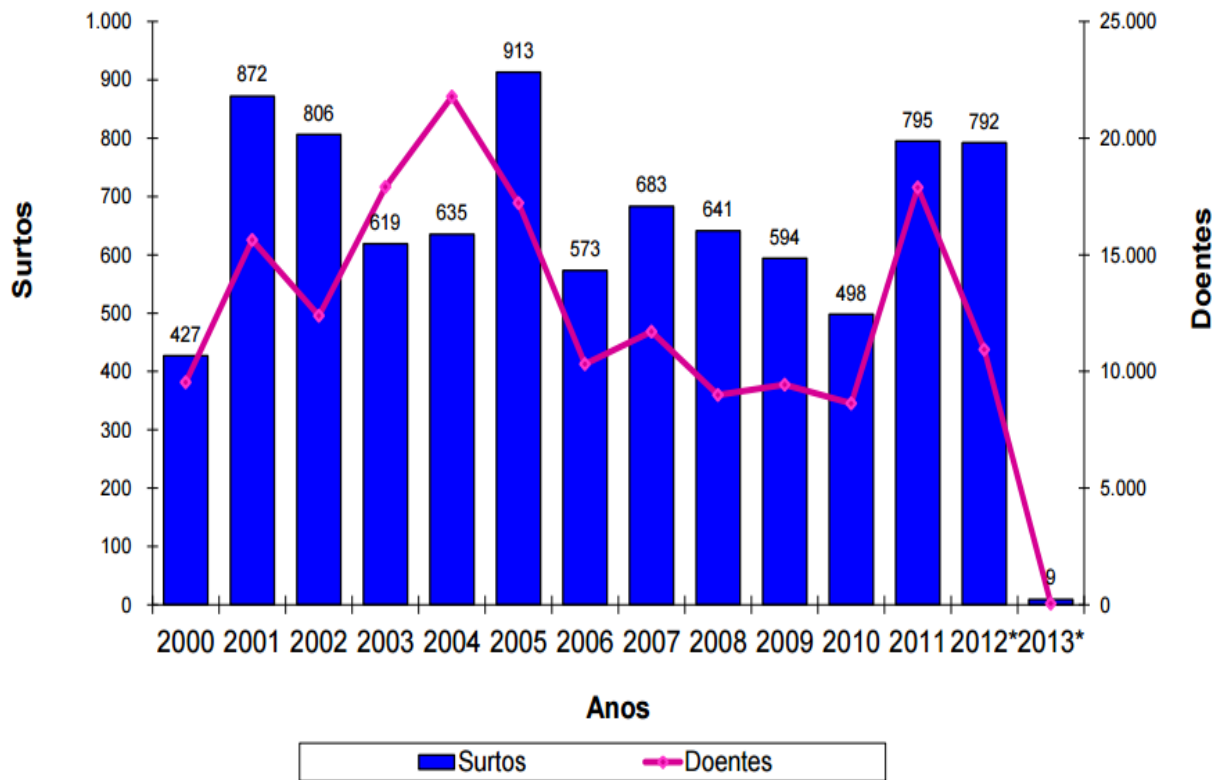


FIGURA 3. Número de Surtos e de doentes por DTA no Brasil entre 2000 e 2012. Fonte: Serviço de Vigilância em Saúde- SVS (2013).

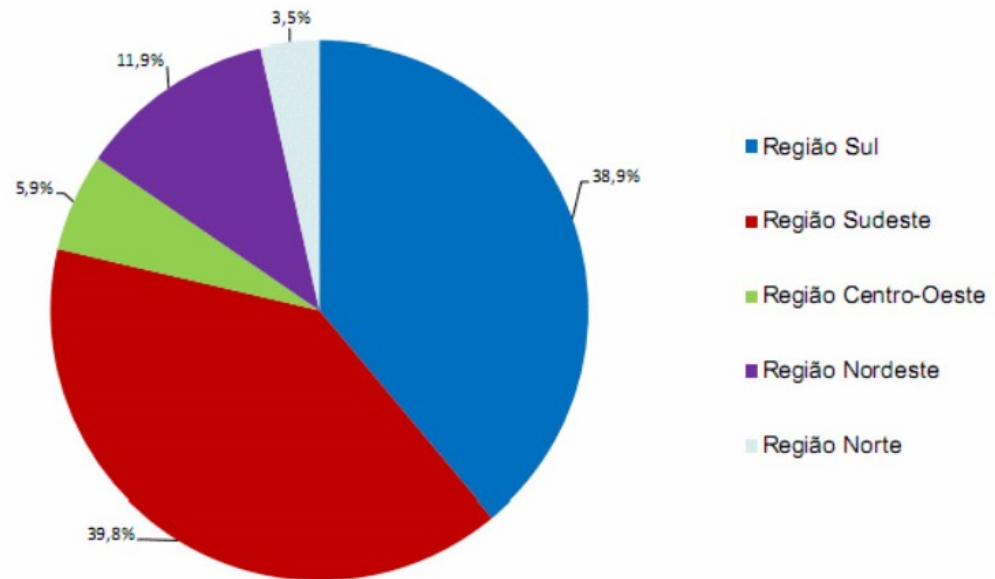


FIGURA 4. Proporção dos surtos de DTA por regiões do Brasil entre 2000 e 2013. Fonte: SVS, 2013.

Número de surtos de DTA por tipo de alimento. Brasil 2000 - 2013

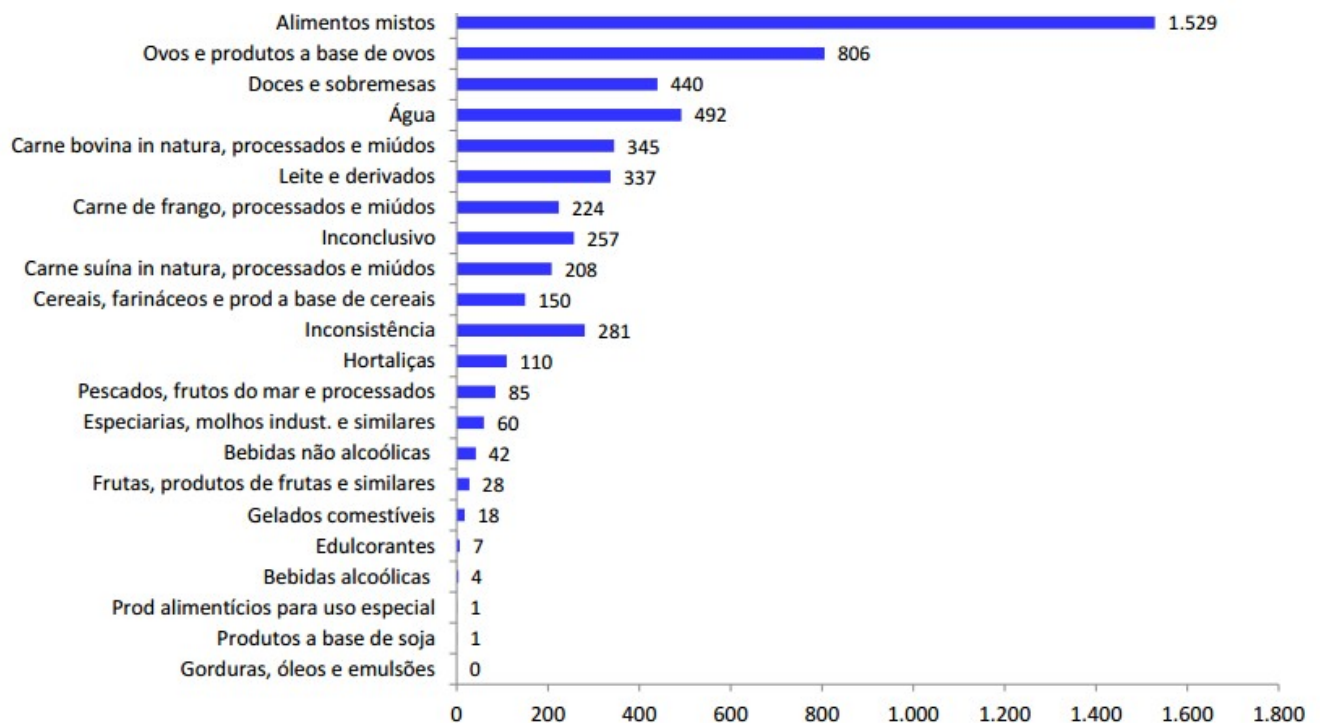


FIGURA 5. Número de surtos por DTA por tipo de alimento no Brasil, entre 2000 e 2013. Fonte: SVS, 2013.

A Resolução RDC n° 12, de 2 de Janeiro de 2001, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) estabelece os padrões microbiológicos para produtos consumidos crus. Embora não haja padrões específicos para hortaliças minimamente processadas, essas podem ser inseridas no grupo de alimentos designados como: "frutas frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto", cuja tolerância máxima para amostra indicativa é de 5×10^2 NMP.g⁻¹ ou UFC.g⁻¹ 7 de coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g.

Com relação à contagem total de aeróbios mesófilos, a RDC n° 12, de 2 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) não estabelece limites, mas alguns padrões ou recomendações internacionais podem ser usados para comparação. As legislações da França e da Alemanha especificam, no ponto de venda final de vegetais preparados prontos para o consumo, os seguintes limites máximos: 2 log UFC.g⁻¹ para *L. monocytogenes*, 7,7 log UFC.g⁻¹ para contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, além de ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra (LEGNANI *et al.*, 2004). Na França, a especificação para coliformes fecais *E. coli* é < 3 log UFC.g⁻¹ e, na Alemanha, < 2 log UFC.g⁻¹.

Em estudos realizados em alfaces minimamente processadas, Oliveira *et al.* (2005) ao analisarem minimamente processados adquiridos em supermercados de Fortaleza encontraram 73% das amostras com contagens elevadas de coliformes a 35°C e 93,3% das amostras estavam contaminadas por *Salmonella* sp. Santos *et al.* (2010) ao analisarem hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Campinas, encontraram alfaces (americana e mimosa) com contagem de *E. coli* superior ao recomendado por legislação. Em Brasília, 19% das alfaces minimamente processadas de hipermercados da cidade estavam contaminadas por coliformes termotolerantes, segundo a legislação vigente (ALMEIDA & RESENDE, 2012).

Em outro estudo, de 143 amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas, comercializados em Botucatu/SP, 112 (78,3%) estavam fora dos padrões microbiológicos por coliformes termotolerantes (SILVA, 2013). Em Uberlândia (MG), Bonnas *et al.* (2005), em seu estudo com vegetais minimamente processados,

identificaram que 100% das amostras estavam fora do padrão estabelecido pela legislação para coliformes termotolerantes.

Os resultados indicam que hortícolas minimamente processados podem apresentar um perigo aos consumidores, sinalizando a importância da correta sanitização dos produtos.

2.8 Sanitização

A sanitização de alimentos como frutas e hortaliças frescas, de acordo com o Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América (2001), é designada como um processo eficaz em destruir ou reduzir o número dos microrganismos patogênicos, sem afetar a qualidade ou segurança do produto para o consumidor. Segundo Evangelista (2000), para uma sanitização eficiente é importante saber e determinar a concentração, temperatura, tempo de exposição e ação mecânica adequada para cada sanitizante. Além disso, a efetividade do sanitizante tem relação direta com a colonização inicial com bactérias na superfície do produto, com o patógeno contaminante e tipo de tratamento (ERICKSON, 2012). Já a eficácia dos sanitizantes depende das características físico-químicas do produto a ser higienizado, do tipo de micro-organismo alvo, do tempo de contato e da concentração da solução de sanitização. Alguns sanitizantes são apropriados para o uso em lavagem direta das superfícies dos alimentos inteiros ou processados, outros somente para processos de lavagem com água em equipamentos, recipientes ou aparelhos (ELPHICK, 1998; SAPERS & SIMMONS, 1998).

A sanitização pode ser realizada por meio de procedimentos físicos ou químicos aplicados de forma adequada. O processo físico consiste na utilização de vapor (água quente), raios gama (irradiação), ozônio (O₃), luz pulsante, radiação ultravioleta (UV) e outros, já o processo químico emprega o uso de agentes químicos, tais como, cloro, ácidos orgânicos, agentes umectantes, quaternário de amônia e compostos iodados (BARI *et al.*, 2003; BERBARI *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2006; VIEITES *et al.*, 2005).

2.8.1 Sais de Hipoclorito

Os produtos clorados, como o hipoclorito de sódio, constituem o grupo de compostos sanitizantes mais utilizados nas indústrias de alimentos e serviços de alimentação por serem de baixo custo e de fácil acesso. A Secretaria da Saúde do estado do Rio Grande do sul por meio da Portaria 78/2009 aprova o uso de hipoclorito de sódio a 2,0 - 2,5% nas concentrações de 100 a 250 mg/L durante 15 minutos com posterior enxague com água potável para hortifrutigranjeiros.

O hipoclorito de sódio é eficaz em reduzir a população de bactérias e fungos, vírus. Em dissociação em água origina hidróxido de sódio (NaOH) e ácido hipocloroso (HOCl). O agente germicida desta dissociação é o ácido hipocloroso, que se dissocia em H⁺ e no íon OCl⁻



Este equilíbrio é dependente do pH. Para valores de pH acima de 7 prevalece o íon hipoclorito e abaixo de 7,0, o ácido hipocloroso, conforme Figura 6

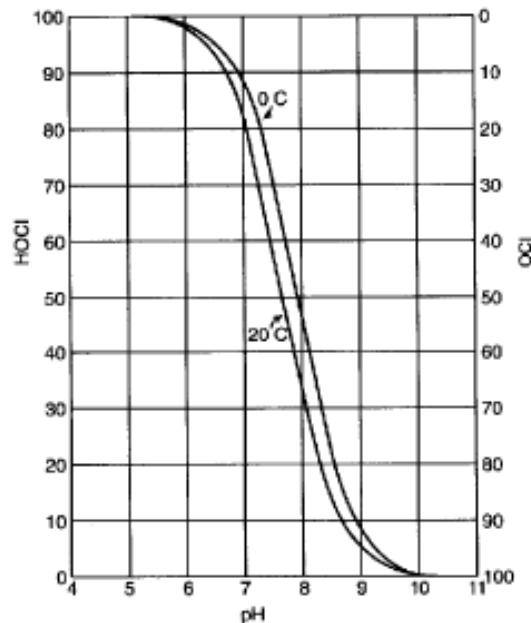


FIGURA 6. Distribuição do ácido hipocloroso e do íon hipoclorito em água, em diferentes valores de pH e temperatura.

Comprovadamente, o ácido hipocloroso exerce maior ação desinfetante que o íon hipoclorito (OCl^-), o que se explica pela maior facilidade que o ácido tem de penetração através da parede celular, por ser uma molécula pequena e neutra. O íon hipoclorito por sua vez tem maior dificuldade em atravessar a parede celular e atingir o sistema enzimático em função da sua carga negativa. Alguns mecanismos de ação são propostos para explicar o efeito de compostos clorados em microrganismos. Um dos mecanismos assinala que os compostos clorados, em sua forma não-dissociada, penetram através da membrana celular, oxidando os grupos sulfidrílicos ($-\text{SH}$) e, desta forma, inibindo certas enzimas importantes da via glicolítica. Um outro mecanismo indica que há a formação de compostos N- clorados tóxicos pela combinação do cloro com proteínas da membrana celular. Ainda há a proposição que os compostos clorados danificam as membranas dificultando o transporte de carboidratos e de aminoácidos o que pode resultar no extravasamento de compostos celulares. Os compostos poderiam provocar uma descarboxilação oxidativa de aminoácidos, formando nitrilas e aldeídos ou reagir com DNA, oxidando as bases purínicas e paralisando a síntese proteica. Por fim há um mecanismo que indica que

há a inibição da captação de oxigênio e as fosforilações causando danos a algumas macromoléculas e que os compostos clorados também podem causar alterações cromossômicas (ANDRADE, 2008).

Há diversos estudos em relação à eficácia do uso de cloro em alfaces. Em 1998, a WHO informou que folhas de alfaces sanitizadas com cloro (200 mg/L) por 10 min apresentaram reduções de 1,79 log para *Salmonella*, 2,48 log para *E. coli* 0157:H7 e 0,33 log para contagem total de aeróbios mesófilos. Lang *et al.* (2004) observaram reduções de 1,42 log de *E. coli* 0157:H7 em alfaces sanitizadas com cloro (200 mg/L) por 5 min. Estudos realizados com alface demonstraram que a imersão por 15 minutos em solução contendo 70 mg/L de cloro confere a alface minimamente processada uma vida útil de seis dias armazenadas a temperatura de 2 °C. Quando é aplicada uma solução contendo 100 a 130 mg/L, a vida útil aumenta para nove dias nas mesmas condições de armazenamento (BERBARI *et al.*, 2001).

Crescentes preocupações de saúde pública sobre a possível formação de compostos orgânicos clorados, como por exemplo, cloraminas e trihalometanos e o surgimento de novos patógenos mais tolerantes, têm levantado dúvidas em relação à utilização de cloro por parte da indústria de minimamente processados (SINGH *et al.*, 2002). Trihalometanos são consideradas potenciais substâncias causadoras de tumores em roedores, e relacionadas a uma maior taxa de câncer. Os trihalometanos foram classificados como possíveis agentes carcinogênicos em humanos pela Agência Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (KIM *et al.*, 2000). Outra preocupação sobre a aplicação de cloro como um agente de desinfecção é a prolongada exposição aos vapores de cloro, que pode resultar na irritação da pele e do trato respiratório dos trabalhadores (BEUCHAT, 1998). Além disso, a segurança e eficácia de cloro pode ser a razão das restrições de uso por agências reguladoras nos EUA (SAPERS, 2001). Em alguns países europeus, incluindo a Alemanha, Holanda, Suíça e Bélgica, o uso de cloro no processamento de produtos é proibido (ARTES & ALLENDE, 2005, ARTES *et al.*, 2009 ; RICO *et al.*, 2007).

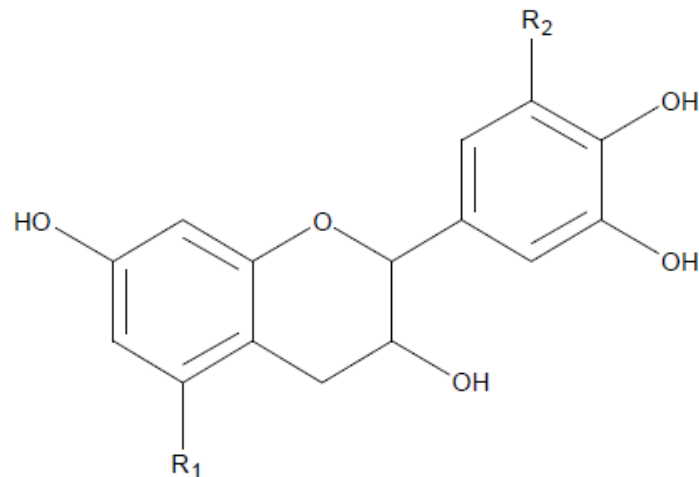
2.8.2 Taninos

Os taninos são moléculas fenólicas, encontradas nas formas de monômeros, oligômeros ou polímeros, que possuem a capacidade de formar complexos com proteínas e outras macromoléculas e minerais (TANAC, 2003). Além disso, são compostos responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. A adstringência é devida a precipitação de glicoproteínas salivares ocasionando a perda do poder lubrificante da mucosa bucal (MONTEIRO *et al.*, 2005). Os taninos são conhecidos por seu papel biológico de defesa química dos vegetais contra o ataque de herbívoros e a infecção por microrganismos patogênicos (SCALBERT, 1991; ZUCKER, 1983). Taninos são também relatados por possuir efeitos antinutricionais, que estão relacionados com a sua habilidade de ligação com proteínas, polímeros como a celulose, hemicelulose e pectina e alguns minerais (MCSWEENEY *et al.*, 2001).

As principais aplicações industriais de taninos são curtimento de couro, fabricação de tintas, produção de agentes flocculantes e coagulantes para tratamento de água. Na indústria alimentícia o desenvolvimento de sabor adstringente em vinhos, sucos e outras bebidas, podem ser obtidos por adição de taninos. Os taninos também podem ter a função de reagentes para detecção de proteínas e alcaloides.

Os taninos são classificados em condensados e hidrolisáveis. Os taninos condensados, formados pela polimerização de unidades de flavonoides, baseiam-se em unidades monoméricas do tipo flavon-3-ol (MANGRICH *et al.*, 2014), podem frequentemente ser hidrolisados a antocianidinas por tratamento com ácidos fortes, e por isso, são também denominados proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são polímeros heterogêneos que possuem como unidade básica o ácido gálico. Os taninos hidrolisáveis são moléculas de tamanho menor que os taninos condensados e podem ser hidrolisados mais facilmente com uso de ácidos diluídos (SANTOS & MELLO, 1999).

O tanino da *Acacia mearnsii* é um tanino condensado, e os seus principais monômeros isolados de sua casca são galocatequina e o robinetinidol, como demonstrados na Figura 7.



$R^1 = H, R^2 = OH$; robinetinidol $R^1 = H, R^2 = H$; fisetinidol
 $R^1 = OH, R^2 = OH$; galocatequina $R^1 = OH, R^2 = H$; catequina

FIGURA 7. Principais monômeros da *Acacia mearnsii*. Fonte: Mangrich *et al.*, 2014.

A preparação do polímero orgânico catiônico a partir do tanino extraído da *Acacia mearnsii*, ocorre por meio do mecanismo proposto por Mannich (BELTRAN-HEREDIA *et al.*, 2010; REED & FINCK, 1997). Na sequência de reações a partir do tanino condensado (Figura 8), ocorre primeiramente a formação do cloreto de imínio pela reação do cloreto de amônio, ou de outra amina que se queira usar, reagindo com o aldeído fórmico. Depois o cátion imínio, $-CH_2NH_3^+$, é inserido na posição 6 ou 8 do anel A do polímero condensado formando o polímero orgânico catiônico, denominado Tanfloc (Figura 9).

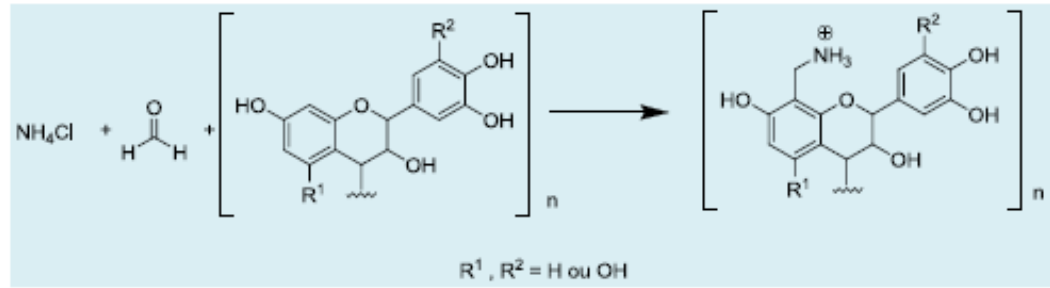


FIGURA 8. Reação de obtenção do polímero orgânico catiônico via reação de Mannich. Fonte: Mangrich *et al.*, 2014

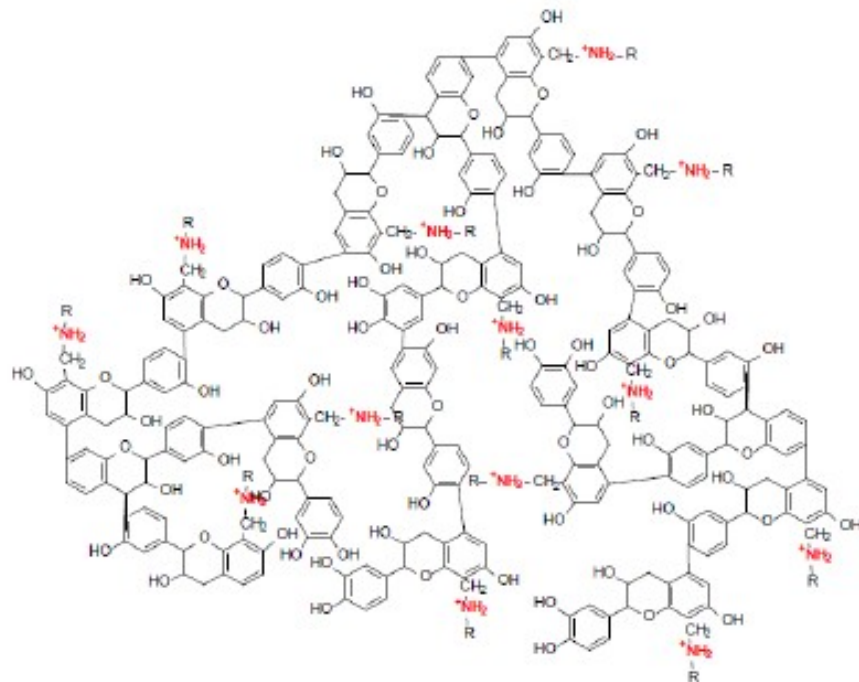


FIGURA 9. Estrutura polimérica do Tanfloc. Fonte: Mangrich *et al.*, 2014

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, renais e do sistema urinário e no controle de processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996; DE BRUYNE *et al.*, 1999). Também é atribuída aos taninos uma potencial ação antimicrobiana que pode ser explicada por três hipóteses: a primeira pressupõe os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os

substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos modificando seu metabolismo. Por fim, a terceira hipótese fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Uma série de microrganismos são sensíveis a taninos, dentre elas *S. aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L), o fungo *Fomes annosus* teve sua multiplicação inibida (CASTRO *et al.*, 1999).

Cúnico *et al.* (2003) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Acacia longifolia* sobre a multiplicação das bactérias patogênicas *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* através do método da infusão em gel indicando inibição da multiplicação de *S. aureus* e em menor grau da multiplicação de *P. aeruginosa*.

Hernandez *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato etanólico de raízes de *Acacia farnesiana* em 25 cepas bacterianas onde a planta apresentou efeito antibacteriano em sete cepas, dentre elas, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Extratos de folhas, caules e flores de *Acacia aroma* foram avaliados por Arias *et al.* (2004) em relação a atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212) e bactérias Gram-negativas (*E. coli.*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922). Os autores concluíram que extratos de folhas e flores apresentaram atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Cinthia (2008) observou que taninos extraídos de *Psidium guineense* apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Este estudo também verificou que quanto maior o teor de tanino extraído da planta, maior é a inibição do crescimento bacteriano.

2.9 Referências bibliográficas da Revisão bibliográfica

ALMEIDA, A.G.; RESENDE, A. Análise microbiológica em alfaces alfaces (*Lactuca sativa* L.) e couves (*Brassica oleracea* L.) minimamente processadas e comercializadas em Brasília - DF. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v.7, n.3, p.52-59, 2012.

ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412p.

ANDRADE, L.F. et al. **Avaliação das perdas de frutos comercializados nas feiras livres de Bananeiras e Solânea – PB**. Paraíba, 2008. Disponível em: <http://www.seminagro.com.br/trabalhos_publicados/3jornada/02ciencia_tecnologia_de_alimentos/CTA0221.pdf>. Acesso em: 5 maio 2014.

ANJO, D.L.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, Rio de Janeiro, v.3, n.2, p.145-154, 2004.

ARIAS, et al. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. **Life Sciences**, New York, v.75, p.191–202, 2004.

ARTÉS, F.; ALLENDE, A. Processing lines and alternative preservation techniques to prolong the shelf-life of minimally fresh processed leafy vegetables. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v.70, n. 5, p. 231- 245, 2005.

ARTÉS, F.; ALLENDE, A. Consumer-oriented approach for keeping quality of minimally fresh processed vegetables. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 682, p. 1801-1810, 2005.

ARTÉS, F.; CASTAÑER, M.; GIL, M.I. Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. El pardeamiento enzimático de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. **Food Science and Technology International**, London, v. 4, n. 6, p. 377-389, 1998.

ARTÉS, F.; GOMEZ, P.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V.; ARTES-HERNANDEZ, F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 51, n.3, p. 287 -296, 2009.

BARI, M.L. et al. Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 on alfafa, radish, and mung bean seed. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n. 5, p.767-774, 2003.

BATTIN, T.J. et al. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 76-81, 2007.

BELTRAN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTIN, J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. C. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 162, p. 1019, 2010.

BERBARI, S.A.G.; PASCHOALINO, J.E.; SILVEIRA, N.F.A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 197-201, 2001.

BEUCHAT, L.R. et al. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p.1305-1311, 1998.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, seção 1, p. 48, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa Conjunta número 9, de 12 de novembro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 2, 14 nov. 2002

BONNAS, D.S. et al. Qualidade higiênico-sanitária de vegetais minimamente processados, comercializados no município de Uberlândia, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, p. 100-103, 2005.

CALBO, A.G.; LUENGO, R.F.A. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa/Hortaliças, 2011. Disponível em: <<http://mais500p500r.sct.embrapa.br/view/pdfs/90000021-ebook-pdf.pdf>>. Acesso em: maio 2014.

CARDOSO, C.C. et al. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n.01, p.59-61, 2003.

CASTRO, H. G. et al. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.), em diferentes épocas de colheita em Viçosa – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 1, p. 29-33, 1999.

CEAGESP. **Alface**. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/produtos/produtos/alface>>. Acesso em: 20 julho de 2013

CEASA. Centrais de Abastecimento. **Dados de entrada de alface na CEASA para comercialização**. Disponível em: <<http://www.ceasars.com.br>>. Acesso em 10 mar. 2015.

CENCI, S.A. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**: tecnologia, qualidade e sistemas de embalagem. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. 144 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 2009–2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, Atlanta, v. 62, n.3, 41–47, 2013.

CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B. Processamento mínimo de alface. In: MORETTI, C.L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, SEBRAE, 2007. cap.16, p.301-341.

CHITARRA, M.I.F. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 113 p. (Apostila)

CHUNG, K.T. et al. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, London, v. 38, p. 421-464, 2008.

CINTHIA, G. R. **Atividade Antibacteriana de taninos extraídos de folhas de *Psidium guineense* Sw. (MYRTACEAE)**. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, 2008.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, p.1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, New York, v. 238, p.86-95, 1978.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 26–38, 2010.

CROXEN, M.A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

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

CÚNICO, P.C. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e triage fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.13, n.2, p.61-65, 2003.

DAVEY M.E.; O'TOOLE G.A. MICROBIAL biofilms: From ecology to molecular genetics. **Microbiology and molecular biology reviews**, New York, v. 64, p. 847-867, 2000.

DE BRUYNE, T. et al. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**. Oxford, v. 27, p. 445-459, 1999.

DEERING, A.J.; MAUER, L.J.; PRUIT, R.E. Internalization of E coli O157:H7 and Salmonella spp. In plants: a review. **Food Research International**, Kidlington, v. 45, p. 567-575, 2012.

DURIGAN, J. F. O processamento mínimo de frutas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza. **Palestra...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. 12 p.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2013). Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). **EFSA Journal**, 11(1), 3025. 138 pp.

ELPHICK, A. Fruit and vegetables washing systems. **Food Processing**, Chicago, v. 67, n.1, p. 22-23, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.(EMBRAPA). **Produção de Mudas de Hortaliças em Ambiente Protegido**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 22p. (Documentos, 72).

ERICKSON, M. C. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 3, p. 283 - 319, 2012

ERICKSON, M.C. et al. Surface and internalized Escherichia coli 0157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray contaminated irrigation water. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.73, p. 1023-1029, 2010.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2000. 652p.

FAO/WHO. **Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities**. 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/a0822e/a0822e.pdf>>. Acesso em: jan 2015

FAO/WHO. **Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables**. (Meeting Reports. Microbiological Risk Assessment Series, No.14). Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i0452e.pdf>> Acesso em: 14 dez. 2014.

FERNANDES, A.A. et al. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p.195-200, 2002.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 623-633, 2010.

FONSECA, M.J.O.; SOARES, A.G.; JÚNIOR, M.F. **Processamento Mínimo de Vegetais**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2009.

FRANZ, E. et al. Quantification of contamination of lettuce by GFP expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Food Microbiology**, London, v. 24, n.1, p.106–112, 2007.

GANDHI, M. et al. Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella* Stanley to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n.12, p.1891–1898, 2001.

GHANNOUM M; O'TOOLE G.A. **Microbial biofilms**. Washington DC: ASM Press, 2001.

GOMES, C. et al. Pendleton, M. Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.135, n. 3, p. 238–247, 2009

GOTO R. Reflexões sobre a cadeia de frutas e hortaliças. In: AGRIANUAL 2010. Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2010. p. 345-347p.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 95-108, 2004.

HARRISON, J.J.; CERI, H.; TURNER, R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, p. 928-938, 2007.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 59, p. 205-215, 1996.

HENSE, B.A. et al. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 230-239, 2007.

HERNÁNDEZ, N.N.R. et al. Actividad antimicrobiana de *Waltheria indoca* y *Acacia farnesiana*. **Revista CENIC Ciências Biológicas**, La Habana, v.40, n.2, 2009.

HENZ, G.P; SUINAGA F. **Tipos de Alface Cultivados no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA, nov. 2009. (Comunicado Técnico 75) Disponível em:

<http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2009/cot_75.pdf>. Acesso em 17 jul 2014.

HENZ, G.P.; CALBO, A.G.; MALDONADE, I.R. **Manuseio Pós-Colheita de Alface**. Brasília: Embrapa/ Hortaliças, 2008. Disponível em: <http://bbeletronica.cnpq.embrapa.br/2008/ct/ct_68.pdf>. Acesso em: maio 2014.

HOLVOET, K. et al. Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.171, p. 21–31, 2014.

HUA, G.; RECKHOW, D. A. Comparison of disinfection by product formation from chlorine and alternative disinfectants. **Water Research**, New York, v. 41, p. 1667–1678, 2007.

HUNT, S.M. et al. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 7418-7425, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008/2009**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf>. Acesso em: 01 de julho 2013.

IFPA. **International fresh-cut produce association**. Fresh cut. Disponível em: <<http://www.fresh-cuts.org>>. Acesso em: 2 out 2014.

ITOH, Y. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 present in radish sprouts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n.4, p. 1532–1535, 1998.

JABLASON, J.; WARRINER, K.; GRIFFITHS, M. Interactions of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n.1, p. 7–18, 2005.

JAHID, I.K.; HA, S. A Review of Microbial Biofilms of Produce: Future Challenge to Food Safety. **Food Science and Biotechnology**, Korea, v. 21, n. 2, p. 299-316, 2012.

KAPLAN, B. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 89, p. 205-218, 2010.

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

KIM C.; HUNG Y. C.; BRACKETT, R. E. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 199-207, 2000.

KLERKS, M. M. et al. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. **The ISME Journal**, New York, v.1, n.7, p. 620–631, 2007

KROUPITSKI, Y. et al. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 19, p. 6076–6086, 2009.

LANG, M. M.; HARRIS, L. J.; BEUCHAT, L. R. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p. 1092 – 1103, 2004.

LEGNANI, P. P.; LEONI, E. Effect of processing and storage conditions on the microbiological quality of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 1061-1068, 2004.

LIMA K.S.C. et al. Efeito da irradiação ionizante na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucus carota*L.) cv. NANTES. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.202-208, 2001.

LI, H.; TAJKARIMI, M.; OSBURN, B. I. Impact of vacuum cooling on *Escherichia coli* O157:H7 infiltration into lettuce tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 10, p. 3138–3142, 2008.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infections biofilm be controlled 372 by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, New York, v. 5, p. 517-528, 2009.

MAI-PROCHNOW, A. et al. Ecological advantages of autolysis during the development and dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, p. 5414-5420, 2006.

MANGRICH, A. S. et al. Química Verde no Tratamento de Águas: Uso de Coagulante Derivado de Tanino de *Acacia mearnsii*. **Revista Virtual Química**, Niterói, v. 6, n. 1, p. 2-15, 2014.

MARTINS, A. C. A. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) comercializada na cidade de Bananeiras-PB. In: JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 3., 2008, Bananeiras, PB. **Anais eletrônicos...** Bananeiras: UFPB, 2008. Disponível em: <http://www.seminagro.com.br/trabalhos_publicados/3jornada/02_ciencia_tecnologia_de_alimentos/CTA0220.pdf>. Acesso em: nov .2014

MATTIUZ, B. et al. Processamento mínimo de uvas de mesa sem semente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 226-229, 2004.

MCSWEENEY, C.S. et al. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.91, p. 83-93, 2001.

MELO, M.F. et al. **Alface**. Brasília : EMBRAPA hortaliças, 2012. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/alface.htm>. Acesso em: 02 jul. 2013.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORETTI, C.L.; Boas Práticas agrícolas para a produção de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, 27p. 2003.

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

MORETTI, C.L.; MATTOS, L.M. **Processamento mínimo de alface crespa**. Brasília, DF : EMBRAPA, dez. 2006. (Informe Técnico nº 36) Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2006/cot_75.pdf>. Acesso em 13 jul. 2014.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M.; JACQUES, M.A. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1570-1576, 1997.

MOOTIAN, G.; WU, W. H.; MATTHEWS, K. R. Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 from soil, water, and manure contaminated with low numbers of the pathogen to lettuce plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n.11, p. 2308–2312, 2009.

NABI, O.M.A. et al. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L.)Willd. ex Del. var. *nilotica* (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 37 p. 77-79, 1992.

NASCIMENTO, A.R. et al. Sanitização de saladas in natura oferecidas em restaurantes self service de São Luís - MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, p. 92-3, 2002.

NASCIMENTO, M.S.; SILVA, N. Tratamentos químicos na sanitização de morango (*Fragaria vesca* L.). **Brazil Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, p. 11-7, 2010.

NASCIMENTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M.; Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 32-35, 2000.

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

OLIVEIRA, A. M. C. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de alface minimamente processada, comercializada em Fortaleza, CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 80-84, 2005.

OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V.M.; BERGAMINI, A.M.M. et al. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, Guildford, v.22, p.1400-1403, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Estratégia Global para a Alimentação Saudável, Atividade Física e Saúde**: 57^a Assembléia Mundial de Saúde: Wha 57.17 8^a sessão plenária de 22 de Maio de 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Doenças crônicas degenerativas e obesidade**: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília: OPAS, 2003.

PAN, J.; REN, D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, p. 1581-1601, 2009.

PIROVANI, M. E. Quality of minimally processed lettuce as influenced by packaging and chemical treatment. **Journal of Food Quality**, Westport, v.21, p.475-484, 1998.
RICO, D. et al. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.18, n.7, p.373 – 386, 2007.

REED. P. E.; FINCK, M. R.; *U.S. Patent 5,659,002*, 1997.

ROBINS, J.B. et al. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, p. 494-498, 2005

RODRIGUES, R. Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 42, p. 152-164, 2014.

SAABOR, A.; ROJO, F. Hortifrúti Embalados e Pré-Processados. **Revista SuperHiper**, Sao Paulo, p. 8-14, 2002.

SANTOS, T.B.A. et al. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazil Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 141-146, 2010

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. **Taninos**. In: FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed da UFRGS, 1999. p. 614-656

SANTOS, Y.T.O. **Qualidade sanitária das hortaliças em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência das soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli***. 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) - Programa de Pós Graduação da Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador (BA), 2007.

SAPERS, G.M. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. **Food Technology and Biotechnology**, Kačičeva, v. 39, p. 305–311, 2001.

SAPERS, G.M.; SIMMONS, G.F. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 2, p. 48-52, 1998.

SÃO JOSÉ, J.F.B.; ANDRADE, N.J.; RAMOS, A.M.; VANETTI, M.C.D.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J.B.P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, Guildford, v.45, p.36-50, 2014.

SCALLAN E et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.17, n.1, p. 7–15, 2011.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCHIKORA, A. et al. The dark side of the salad: *Salmonella typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. 2279, 2008.

SEBRAE. **Hortaliças minimamente processadas** – Estudo de Mercado SEBRAE/ESPM. 2008. Disponível em: <[http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/AD2DEFF96449FB0F832574DC0046776D/\\$File/NT0003907A.pdf](http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/AD2DEFF96449FB0F832574DC0046776D/$File/NT0003907A.pdf)>. Acesso em: 5 julho de 2013.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Portaria Nº 78/2009, de 30 jan. 2009. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. **Diário Oficial**, Porto Alegre, RS, p.6, 30 jan. 2009.

SIGRIST, J.M.M. Manuseio pós-colheita de frutas e hortaliças. In: CURSO de atualização em tecnologia de resfriamento de frutas e hortaliças. Campinas, 1998. v. 2, p. 11-18.

SINGH, N. et al. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O147:H7 on lettuce. **Food Microbiology**, London, v. 19, p. 183-193, 2002.

SILVA, E.O. et al. Segurança microbiológica em frutas e hortaliças minimamente processadas. In: SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE VEGETAIS FRESCOS CORTADOS, 2006, San Pedro, SP. **Anais ...** São Paulo, 2006. p.37-46.

SILVA, A.C.O et al. Radiação em alimentos. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.139, p.17-23, 2006.

SILVA, B.L. **Avaliação higiênico-sanitária de produtos minimamente processados comercializados em Botucatu/SP. Perfil genotípico e fenotípico das cepas de *staphylococcus* sp, em relação à produção de biofilme e de enterotoxinas.** 2013. 51f. Dissertação (Mestrado em Biologia de parasitas e microrganismos) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu (SP), 2013.

SPERANDIO, V. et al. Bacteriahost communication: The language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 8951-8956, 2003.

STEWART PS, MCFETERS GA, HUANG CT. Biofilm control by antimicrobial agents. In: BIOFILMS II: Process Analysis and Applications. New York, NY, USA Wiley-Liss, 2000. p. 373-405.

STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 199-210, 2008.

STOODLEY, P.; DEBEER, D.; LEWANDOWSKI, Z. Liquid flow in biofilm systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2711-2716, 1994.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf>. Acesso em:15 junho 2013.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados de surtos Alimentares no Brasil.** Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.com/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2013/#ixzz2YzitcriX>>. Acesso em: 20 maio 2013

TABELA brasileira de composição de alimentos/NEPA – UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl. Campinas, SP: Núcleo de Estudos e Pesquisas Alimentação, 2011.

TANAC. **Tanfloc:** manual prático para o uso em estações de tratamento de águas de abastecimento. Montenegro: TANAC S.A., 2003. 122p.

TRIPATHI, P.; SHUKLA, A. K. Emerging non-conventional technologies for control of post harvest diseases of perishables. **Fresh Produce**, Isleworth, v. 1, p.111-120, 2007.

UKUKU, D.O.; FETT, W.F. Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1093-1099, 2002.

VIEITES, R.L. et al. Efeito da radiação gama na sanitização da manga minimamente processada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.135, p.68-73, 2005.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. et al. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, p. 49–54, 2004.

YOO, J. S. et al. Molecular cloning and characterization of CMCCase gene (celC) from *Salmonella typhimurium* UR. **Journal of Microbiology**, v.42, n.3, 205–210, 2004.

ZHANG, G. D. et al. Lack of internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) after leaf surface and soil inoculation. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 7, n. 10, p. 2028–2037, 2009.

ZHANG, H.; ZHENG, X. D.; YU, T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. **Food Control**, Guildford, v.18, p. 287- 291, 2007.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function An ecological perspective. **The American Naturalist**, Chicago, v. 121, n. 3, p. 335-365, 1983.

WARRINER, K. et al. Interaction of *Escherichia coli* with growing salad spinach plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.10, p. 1790–1797, 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION, FOOD SAFETY UNIT. **Food safety issues: Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review**. Geneva: World Health Organization, 1998. (WHO/FSF/FOS/98.2.)

3.1 Artigo 1 - Effect of tannin extracts on biofilms and attachment of *Escherichia coli* on leaf lettuce

Artigo formatado conforme normas da Revista Food Control.

Effect of tannin extracts on biofilms and attachment of *Escherichia coli* on leaf lettuce

Tâmmila Venzke Klug¹; Júnia Novello^{2,3}; Amanda Moresco¹; Daniela Comparsi Laranja³; Tanira Aguirre⁴; Carolina Bonatto¹; Alessandro de Oliveira Rios⁵; Eduardo Cesar Tondo³; Rinaldo Pires dos Santos⁶, Renar João Bender*¹

¹ Laboratório de Pós Colheita, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Centro de Ciências Exatas, Universidade de Caxias do Sul (UCS). Rua Francisco Getúlio Vargas, 1120, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

³ Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9.500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre/RS, Brazil.

⁴ Tanac S.A., R & D Department. Rua Torbjorn Weibull 199, CEP: 95780-000. Montenegro, Brazil.

*Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS). Rua Francisco Getúlio Vargas, 1120, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

⁵ Laboratório de Compostos Bioativos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9.500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre/RS, Brazil

⁶ Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43423, Sala 208, Campus do Vale, Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author: Renar João Bender – E-mail: rjbe@ufrgs.br – (55 51) 3308-6064

Abstract

Lettuce is often involved in outbreaks of pathogenic *Escherichia coli* and current control strategies have proved ineffective to ensure safe food production. This study focuses in adhesion and formation of biofilm by *E. coli* ATCC 25972 on the surface of lettuce using a viable plate count method and scanning electron microscopy with the objective to compare the efficacy of sanitizing treatments: chlorine (200 mg/l), tannin AQ® (2%), tannin SG® (1%) and tannin SM® (1%). Bacterial cells appeared as individual cells and clusters after 2 h of incubation. Biofilm formation was observed after 24 h of incubation. The SM® and SG® treatments showed reduced count $> 2 \log \text{CFU/cm}^2$ on lettuces, however were less effective in reducing *E. coli* counts after 24 h of incubation compared to 2 h incubation. Our results suggest that the tannin extract SM® is effective to reduce the *E. coli* counts adhered to and under biofilm formation on lettuce leaves and its effect is similar to the use of chlorine solutions.

Keywords: *Lactuca sativa*; *Escherichia coli*; tannin extracts

1. Introduction

Leafy green vegetables (LGVs) are identified as the group of fresh produce commodities of highest concern from a microbiological safety perspective (FAO/WHO, 2008), because they are often produced in open fields and are vulnerable to contamination from contaminated manure used as fertilizer, from soil, from water used for irrigation and from the contact with excrements of wild animals (FAO / WHO, 2008). Some foodborne outbreaks involving vegetables in Brazil have been reported (BRASIL, 2013; Cruz, Cenci, & Maia, 2006). For example, 110 occurrences associated with leafy green vegetables were reported in Brazil from 2000 to 2013 (Brasil, 2013). Bacteria, such as *Salmonella* spp. and pathogenic *Escherichia coli* strains are the main pathogens causing foodborne disease through LGVs (Friesema et al., 2008; Gajraj, Pooransingh, Hawker, Olowokure, 2012; Söderström et al., 2008 and Takkinen et al., 2005).

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is often involved in foodborne outbreaks with leafy green vegetables. The number of outbreaks linked to consumption of contaminated fresh produce, mainly lettuce, appears to have increased since the year 2000. During the period from 1998 to 2007, 12 outbreaks were associated with the consumption of lettuce contaminated with *E. coli*, amounting to 361 reported cases (CSPI, 2009).

Escherichia coli is mesophilic, gram-negative, facultative anaerobe, foodborne pathogen bacteria. In the microbiological analysis of water and foodstuffs, *E. coli* is used to assess the hygienic quality of foods and its detection can also indicate the presence of enteric pathogens, including Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) (Croxen et al., 2013).

Furthermore, the interaction of enteric pathogens like pathogenic strains of *E coli* with plant surfaces can lead to development of biofilms or internalization within plant tissue, as it has been demonstrated (Aruscavage, Lee, Miller & Lejeune, 2006; Olmez & Temur, 2010; Niemira & Cooke, 2010). Biofilms are groups of bacterial cells aggregated in exopolysaccharide materials that serve to protect the cells from environmental stresses, including desiccation and bactericidal agents, in this way, biofilms have been recognized as a common source of foodborne outbreaks (Srey, Jahid & Ha, 2012).

Leafy green vegetables are frequently consumed raw, so sanitizing washes are practical intervention strategies. Chlorine is the most widely used sanitizer because it is inexpensive, easy to use, and reasonably effective. However, concerns about the possible formation of hazardous disinfection by-products (mainly trihalomethanes) have led to the appearance of a multitude of studies searching for alternatives to this disinfectant (Ölmez & Kretzschamr, 2009). Sanitizers that do not form trihalomethanes and appropriate for the disinfection of food are being tested. In addition, today's society appears to be experiencing a trend of green consumerism, so researchers are seeking new ways to significantly reduce pathogens and chemicals simultaneously to ensure the safety of vegetable produce (Sagong et al., 2011).

In this context, tannin have attracted attention due to their biological and physiological properties (Chung, Wong, Wei, Huang & Lin, 1998). Several studies showed the bacteriostatic activity in vitro of tannin extracts against *E coli* (Nabi et al., 1992; Arias, Gomeza, Cudmani & Vattuonec (2004); Voravuthikunchai et al., 2004; Hernández, Saucedo, Cuéllar, Álvarez & Moya 2009). Trentin et al., (2013) observed that tannin are able to inhibit biofilm formation of gram-negative bacteria, such as the *Pseudomonas aeruginosa*. These studies provide a scientific basis that may justify some uses of the tannin extract as saniterzs of lettuce.

The aim of this study was to compare the effectiveness of tannin extracted from *Acacia mearnsii De Wild* and chlorine on the reduction of adhesion and formation of biofilm by *E. coli* ATCC 25972 on the surface of lettuce.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strain and culture conditions

The assays were performed with *Escherichia coli* ATCC 25972. The cells were recovered from -80°C °C frozen stock and 100 μL of the stock were subcultured into 9 mL of brain heart infusion (BHI, HiMedia, India), at 37°C , for 24 h. After vortexing, 100 μL of the incubated

culture were pipetted into 9 mL of fresh BHI and incubated for another 24 h, at 37 °C. Cells were harvested by centrifugation (2 min, 50 rpm) (Hettich, Germany), washed twice with sterile sodium chloride solution (0.9%, w/v) (Dinâmica, Brazil). The cell density was determined by serial dilution and plating on Chromocult medium (Merck, Germany)

2.2 Preparation of tannin extracts and chlorine solutions

Three commercial samples containing tannin extracts of *Acacia mearnsii* De Wild., supplied by Tanac SA (Montenegro, RS) were used in the present study: 1) Weibull AQ is a brownish powder, which consists of a mixture of condensed polyphenols, mainly flavan-3-4-diol with anionic charge and a small percentage of sugars and hydrolysable gums; 2) Tanfloc SG and 3) Tanfloc SM are were supplied in liquid format containing either 32% or 27% active matter, respectively.

Tanfloc is a non-toxic low molecular weight, essentially vegetable, organic cationic polymer that acts as a coagulant/floculant agent for the treatment of water and wastewater (Tanac, 2013). It is obtained through a Mannich reaction of the tannin extract with an amine and an aldehyde molecule (Mangrich, Doumer, Mallmann & Wolf, 2014). The main difference between Tanfloc SG and SM lies on pH, wherein the first presents a range of 1.3 – 2.3 and the latest 0.7 – 1.2 due mainly to their application proposed by the company (Tanac, 2013). All samples were diluted with distilled water.

Chlorine solution was made immediately before use by diluting 2.5% (v/v) sodium hypochlorite (Anhembi, Brazil) in sterile water to achieve the concentration of 200 mg/L. Before washing the produce, pH of the sodium hypochlorite solution was adjusted to 6.5 by adding citric acid. The concentration was verified with chlorine concentration tests strips (Ecolab, USA).

2.3 MIC determination

The minimum inhibitory concentration (MIC) of tannin extracts was determined by standard broth microdilution according with NCCLS (2007). *E coli* inoculum (5 log CFU/ml) was obtained as described in the item 2.1 and 2.2. The tannin extracts were dissolved in sterile distilled water in dilutions from 2.5 mg/mL to 320 mg/mL. Then, 100 µl of the individual extracts, 100 µl of the Muller-Hilton medium (Oxoid, England) and 100 µL of bacteria were dispensed into the 96 well plates. The bacteria and Muller-Hilton medium, without tannin extracts, were used as control. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was

defined as the lowest antimicrobial concentration, which presented visible growth. To confirm MICs and to establish Minimal Bactericidal Concentration MBC, 10 µl of each culture medium were removed from each well and inoculated in Chromocult medium. After 24 h of aerobic incubation, at 37 °C, the presence of colonies was investigated. The MBC was defined as the lowest extract concentration at which 99.9% of the bacteria were killed. All tests were performed in three independent plates.

2.4 Biofilm formation assay

The concentrations of tannin extracts were determined from the MIC and MBC results, and the contact time through preliminary tests that evaluated the effect of tannin on lettuce leaf appearance. The concentration and contact time for the chlorine solution were determined in accordance with Portaria78/2009 of the State of Rio Grande do Sul.

The total biomass attached to each well was measured by crystal violet assay according to Pires, Sillankorva, Faustino and Azeredo (2011) with modifications. Each well of a sterile 96-well polystyrene flat-bottom microtitre plate was filled with 100 µl of BHI medium and, then, 100 µl of *E coli* (Itens 2.1 e 2.2) were added too. The plates were incubated for 24 h, at 37°C. So, the cells were washed twice with a saline solution (0.9% NaCl), and after with 200 µl of sterile distilled water for 1 min and then treated with the following sanitizers (200 µl): sodium hypochlorite (200 mg/L) for 15 min; 2% (w/v) tannin AQ® (pH 5.0) for 10 min, 1 % (w/v) tannin SG® (pH 2.6) for 10 min and 1 % (w/v) tannin SM® (pH 2.4) for 10 min and after time treatment 200 µl of 0,5% (w/v) sodium thiosulfate.

After sanitization treatments, the attached bacteria were fixed with 200 µl of methanol for 15 min and dried for 5 min at room temperature (21°C). A volume of 200 µl of Crystal violet (1% v/v) was used to stain the bacteria for 5 min. After this time, the wells were washed with deionized water, and 200 µl of acetic acid (33% v/v) were added to dissolve the stain. The absorbance was read at ELISA reader at 570 nm. Sample plates treated with different sanitizers were repeated three times with eight evaluations on each plate. Averages of eight evaluations were converted to percentage of biofilm reduction.

2.5 Preparation of lettuce and reduction of background microflora

The preparation of samples was performed according to Jahid, Han and Ha (2014) with some modifications. Fresh crisp leaf lettuce (*Lactuca sativa*) was purchased from a local retailer in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Damaged outer layers were removed from

each lettuce and discarded. The inner intact parts of the samples were aseptically cut into rectangular coupons ($2 \times 2 \text{ cm}^2$) using sterile scalpel which were used immediately after preparation. The sample coupons were treated with sodium hypochlorite (200 mg/l) for 15 min to minimize the background microflora before inoculation with the *E. coli*. The presence of background bacteria was checked using Chromocult medium and it was below detection level ($< 1 \log \text{ CFU/cm}^2$).

2.6 Inoculation and biofilm formation

Spot inoculation was applied according to the method of Srey, Park, Jahid and Sang-Do (2014) with some modifications. Spot inoculation is more consistent, and produces more reproducible results, for the inoculation of a known number of pathogen cells on vegetable surfaces than the dipping method (Beuchat et al., 2001). Only one side of lettuce coupons were inoculated with 50 μl of inoculum ($7 \log \text{ CFU/ml}$) and put into a sterile petri dish. Adhesion and biofilm was formed by incubating the samples at $7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (similar temperature for a commercial refrigerator) for 2h and 24h, respectively.

2.7 Adhesion and biofilm treatment

After incubation, each coupon was washed by dipping in 3 mL of 0.9% (w/v) saline solution to remove unattached or loosely attached cells. Then, the coupons were dipped in 3 mL of sterile distilled water for 1 min and then treated with the following sanitizers (3 mL): sodium hypochlorite (200 mg/l) for 15 min; 2% (w/v) tannin AQ[®] (pH 5.0) for 10 min; 1 % (w/v) tannin SG[®] (pH 2.6) for 10 min and; 1% (w/v) tannin SM[®] (pH 2.4) for 10 min. These concentrations of tannin extracts were determined according to the preliminary results to MIC and sodium hypochlorite according to Brazilian legislation (Brazil, 2007). So, the coupons were dipped in 3 mL of 0,5% (w/v) sodium thiosulfate (Cromoline, Brazil) to neutralize the action of the sanitizers. Samples untreated were used as control. Then the samples were placed in sterile tubes of 9 mL of 0.1% (w/v) peptone water (HiMedia, India), followed by vortex, for 1 min. Serials dilutions were done in peptone water (0.1%) and CFU counts was performed using the microdrop technique. For this, one drop (10 μl) was placed in a Petri plate containing Chromocult solid medium and allowed to run down the plate (Pires, Sillankorva, Faustino & Azeredo, 2011). Plates were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h and after CFUs were counted. Every week, along three weeks, three samples (in triplicate) of lettuce

coupons treated with different sanitizers were evaluated and averages converted to log CFU/cm²

2.8 Scanning electron microscopy (SEM)

E. coli adhesion and biofilm on the coupons samples was observed using SEM after each treatment (sterile distilled water, chlorine and tannin). The selected coupons were fixed in 2.5% glutaraldehyde buffered solution (v/v), (pH 6.9 ± 0,2) for 1 h, at 25 °C ± 2°C, and then washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH= 7.2, 0,1 M) for 1 min. The fixed biofilms were serially treated with 30%, 50%, 70%, 80%, and 95% (v/v) ethanol for 10 min, and twice with 100% ethanol (15 min). Then the biofilms were transferred to a mix of 50% ethanol and 50 % acetone, for 10 min, and pure acetone, for 10 min.

The dehydrated samples (in pure acetone) were placed into metal baskets and dried in a BALZERS CPD 050 critical point dryer. The dried samples were mounted on aluminum stubs with double-sided carbon tape and sputter-coated with approximately 20 nm gold in a BALZERS SCD 050 sputter coater. Subsequently, the samples were observed in a JEOL JSM6060 scanning electron microscope at 5 kV.

2.9 Statistical analysis

The data of biofilm formation trials and adhesion and biofilm treatments were analyzed by one-way analysis of variance using the ANOVA and when F value was significant, Tukey test was applied to compare averages. Statistical significance was considered at P < 0.05. The Shapiro-wilk normality test was applied to verify the normality of the data.

3. Results and discussion

3.1 MIC determination

The MIC values of tannin extracts against *E. coli* ATCC 25972 indicate that these three extracts were suitable as antibacterial agents for further investigation (Table 1). Tannin SM[®] and Tannin SG[®] presented the best antimicrobial activity against *E. coli*. Arias, Gomeza, Cudmani and Vattuonec (2004) showed that leaf and flower fluid extracts of *Acacia aroma Gill. ex Hook et Arn* inhibited *E. coli* ATCC 35218 and *E. coli* ATCC 25922 with values of MIC 0.25 mg/mL. In addition, Nabi et al. (1992) reported that extracts of *Acacia nilotica nilotica*

was able to inhibit *E. coli* ATCC 11229 (MIC of 1.6 mg/mL). Voravuthikunchai et al (2004) observed MIC of 0.19 mg/mL from aqueous extracts of *Acacia catechu* against enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7.

Attention has to be given to the fact that the MIC values determined for the extracts of *Acacia mearnsii* tannin were higher than the results obtained by the authors cited. These results appear that there are probably several mechanisms involved in antimicrobial effects of tannin which depend on the phytochemical compounds of each plant and also that the mode of action probably depends on the individual microorganism as indicated by Scalbert (1991). This could explain the differences in MIC values.

Phytochemical studies of leaves and bark of *Acacia* species disclosed the presence of flavonol and flavone glycosides, aglycones, flavan 3 ols, flavan-3,4-diols and condensed tannin (Seigler, 2003). The extract of *Acacia mearnsii* is mainly composed of an oligomeric mixture of monomers: catechin, gallocatechin, fisetinidol and robinetinidol (Mangrich, Doumer, Mallmann & Wolf, 2014). This complexity and the higher oxygenated nature of gallocatechin and robinetinidol presumably reflects the higher protective first line of defense mechanisms to, for example: microbial intruders (Venter et al., 2012).

From the results of the present study tannin extracts of *Acacia mearnsii* have recognizable antibacterial effects against *E. coli*. The effect of this type of tannin on *E. coli* was studied by Smith, Imlay and Mackie (2003), indicating that auto-oxidation of tannin results in hydrogen peroxide production and, as a result, inhibits growth of *E. coli*. Hydrogen peroxide is an important molecule contributing to oxidative damage in cells. In environments in which tannin produce hydrogen peroxide as a product of auto-oxidation organisms will be inhibited.

3.2 Crystal Violet

The effect of tannin extracts upon *E. coli* biofilm formation on the polystyrene surface, using crystal violet assay, is shown in Figure 1. After 24h of multiplication of *E. coli*, the treatments of chlorine, SM® and SG® presented a reduction of biofilm formation of 78%, 66 and 67%, respectively (Figure 1), whereas the treatment AQ® resulted in the lowest value (54%), a loss of 24% in the biofilm reduction when compared to the chlorine treatment. The treatments didn't show statistically significant by ANOVA ($F=0.5124$; $P=0.7285$).

3.3 The effect of treatments on *E. coli* adhesion and biofilm formed on lettuce

A reduction of 3.44 log CFU/cm² was observed in *E. coli* counts of 2h incubated lettuce samples after treatment with SM®. SG® and chlorine treatments resulted in a reduction of 2.30 log CFU/cm² and 2.26 log CFU/cm², respectively, which wasn't statistically significant ($P > 0.05$) compared with SM®. On the other hand, the lower values were observed in water treatment (0.62 log CFU/cm²) and AQ® (0.36 log CFU/cm²) (Figure 2).

After 24 hours of incubation, the samples presented a reduction of *E. coli*. After the SM®, SG® and chlorine treatments, the samples showed counts of 2.49 log CFU/cm², 2.07 log CFU/cm² and 2.28 log CFU/cm², respectively. Whereas the water and AQ® treatments achieved a reduction of 0.44 log CFU/cm² and 0.49 log CFU/cm² (Figure 2).

In Brazil a chlorine treatment at 200 mg/L (15 min) is the most commonly used sanitizing treatment by the fresh produce industry and also is the only sanitizer approved by Brazilian legislation (Brazil, 2007). Its antimicrobial mechanism is based on the ionization via hydrolysis of sodium hypochlorite (NaOCl) to hypochlorous acid (HOCl), a strong bactericidal agent that penetrates cell walls and reacts with different cell components (Fukuzaki, 2006).

Lang, Harris and Beuchat (2004) indicated that 1.42 log reductions of *E. coli* O157:H7 were obtained on lettuce by treatment of 200 mg/mL for 5 min. Keskinen, Burke and Annous (2009) used chlorine solutions of either 20 or 200 mg/L for 2 min to inactivate *E. coli* O157:H7 on Romaine lettuce inoculated at 4 °C for 18-24 h. The authors observed a reduction of the *E. coli* population by 0.52 and 0.65 log CFU/g, respectively. In the present study the treatment of lettuce with 200 mg/L for 15 min resulted in 2.28 log reduction of *E. coli* after 24 of incubation. The differences observed in terms of log reductions might be attributed to the applied inoculation methods, in addition to chlorine concentrations, contact time and to the targeted microorganisms as indicated by authors like Baur, Klaiber, Wei, Hammes, & Carle, 2005; Beltrán, Selma, Tudela and Gil (2005) and Hua and Reckhow (2007).

Sodium hypochlorite is the most commonly used sanitizing agent, mostly due to its economical aspect. Trihalomethane upsurges, which are carcinogenic compounds, is the negative aspect of the employment of chlorination treatments (Ölmez and Kretzschamr, 2009). For that reason, the absence of residual hazardous compounds to public health on lettuce after treatments with tannin extracts is already a worthy result.

The use of tannin extracts as a sanitizing agent on lettuce is unique. The tannin extracts SM® and SG® signaled *E. coli* cell reductions significantly higher compared to the application of chlorine, whereas the treatment with the AQ extract presented the lowest count reduction, which was comparable to the reductions achieved with the use of water (Figure 2)

Differences in *E. coli* cell counts amongst the tannin extracts might be attributed to diverse pH ranges of the solutions and this fact may be due to the fact that the tannin SM® and tannin SG® are concocted by Mannich reaction, which makes these tannin extracts connected to a quaternary ammonium compound, which is not present in tannin extract AQ®. Quaternary ammonium compounds are reported to have antibacterial properties (McEgan and Danyylyu, 2015).

3.4 SEM

The SM® and SG® treatments were less effective in reducing *E. coli* counts after 24 h of incubation compared to 2 h incubation. Such an efficacy shortfall might be explained by the onset of biofilm formation, presence de exopolysaccharides and the increase in the development of cell aggregates after 24 h of incubation (Figure 4 A), as well observed by Olmez and Temur (2010) and Niemira and Cooke (2010). *E. coli* individual cells settled down on the surface of lettuce leafs without forming aggregates after 2 hours of incubation (Figure 3) enabling removal of the bacteria from the leaf surface, most of all after sanitation treatments with SM®, SG® and chlorine (Figures 3 C to 3 E). It was also possible to observe some clusters of bacterial cells colonizing the veins of lettuce leafs (Figure 3 C). These observations are in accordance with the conclusions of Olmez and Temur (2010). The authors indicate that sanitizing treatments with either ozone, chlorine or organic acids were more effective in the removal of cells after 6 h of incubation than after 24 h incubation.

SEM images after 24 h of incubation showed rod-shaped cells of untreated *E. coli* growing on the lettuce surface, forming a dense and uniform biofilm (Figure 4 A). In the images of the treatments with SM® and chlorine solution it is possible to visualize a low number of bacterial clusters and without biofilm formation. (Figures 4 C and 4 E). After 24 h of incubation, the chlorine and SM® treatments were effective in the reduction of the number of biofilm cells. The images complement the results obtained by the biofilm reductions (Figure 4).

After the 24 h period of inoculation at 7 °C, it is possible to visualize the internalization of *E. coli* into the cavity (antichamber) above the stomatal pore of a lettuce leaf (Figures 4 A, 4 B and 4 D). Gomes et al. (2009) confirm that the preferential port of entry of *E. coli* into vegetable leaves is right through the stomatal cavity. Similar studies (Brandl, 2008; Itoh et al., 1998; Kroupitski et al., 2009; Gomes et al., 2009; Shaw et al., 2008) have demonstrated that bacteria pathogenic to humans are capable to enter natural openings in plants, such as the sub-stomatal cavity of leaves. There is evidence for preferential *E. coli* settling near stomata

as the result of a chemotropic interaction. In *E. coli* O157 that preferential location has been suggested by Shaw et al. (2008) to be dependent on the translocation pore associated with the Type III secretion system (TTSS).

Therefore the ineffectiveness of the sanitizing treatments after 24 h of incubation observed in the present study, primarily by the SG® treatment (Figure 4 D) and the water alone treatment (Figure 4 B), should be also ascribed to the internalization of *E. coli* cells into unreachable tissue structures such as stomata and leaf cavities.

Conclusion

The tannin extract SM® is capable to reduce the counts of *E. coli* adhered to and under biofilm formation on lettuce leaves and its effect is similar to the use of chlorine solutions. Tannin extracts might turn out to be alternatives to chlorine as sanitizing media in view of the fact that they are rather inexpensive, obtained from a natural and renewable source, easily formulated and do not give off potential carcinogenic residues. To our knowledge, this is the first work showing promising results of tannin based commercial available products as natural sanitizers for lettuce. Further studies are necessary to evaluate the feasibility of processes involved in sanitization of lettuces from field until final consumers. However, there is need for ongoing studies as to determine eventual detrimental effects as consequence of continuous ingestion.

Table 1: Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) values of tannin extracts from *Acacia mearnsii* against *E. coli* ATCC 25972

| Tannin Solutions | MIC (mg/mL) | MBC (mg/mL) |
|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Tannin AQ® | 20 | 20 |
| Tannin SG® | 5.0 | 10 |
| Tannin SM® | 5.0 | 10 |

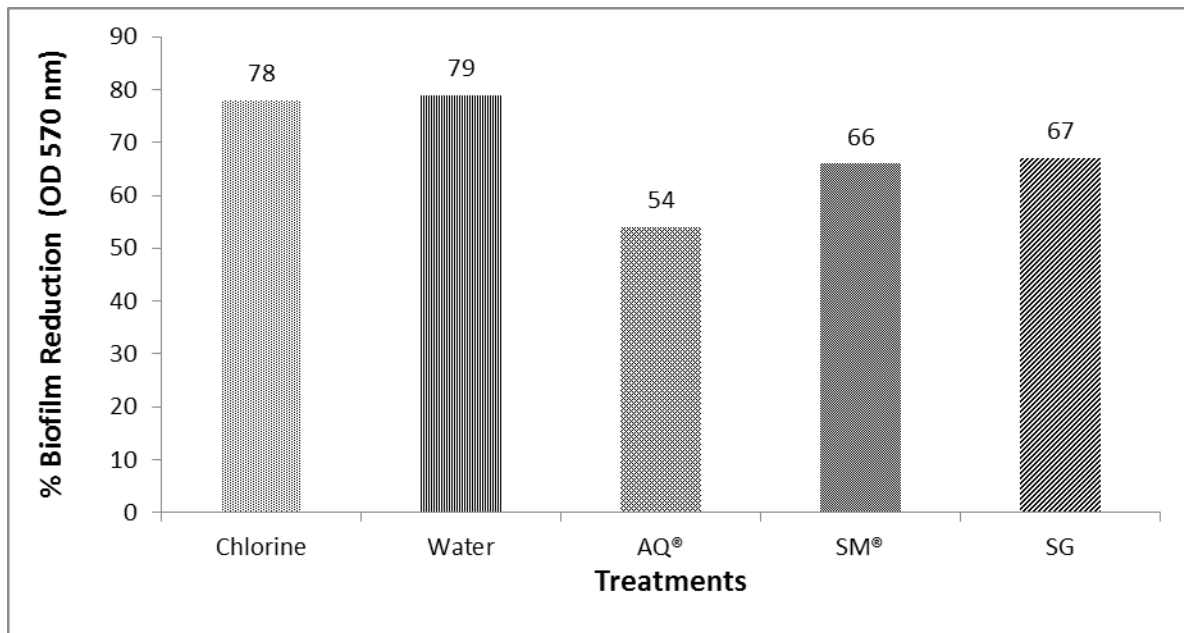


Figure 1: Reduction in percentage of biofilm formation on lettuce leaf coupons treated with different tannin extracts of *Acacia mearnsii* assessed by Crystal violet assay for *E. coli* where ■ Water (1 min), ▨ Chlorine (200 mg/L / 15 min), ■ SM® (1% / 10 min), ▩ SG® (1% / 10 min), ▩ AQ® (2% / 10 min).

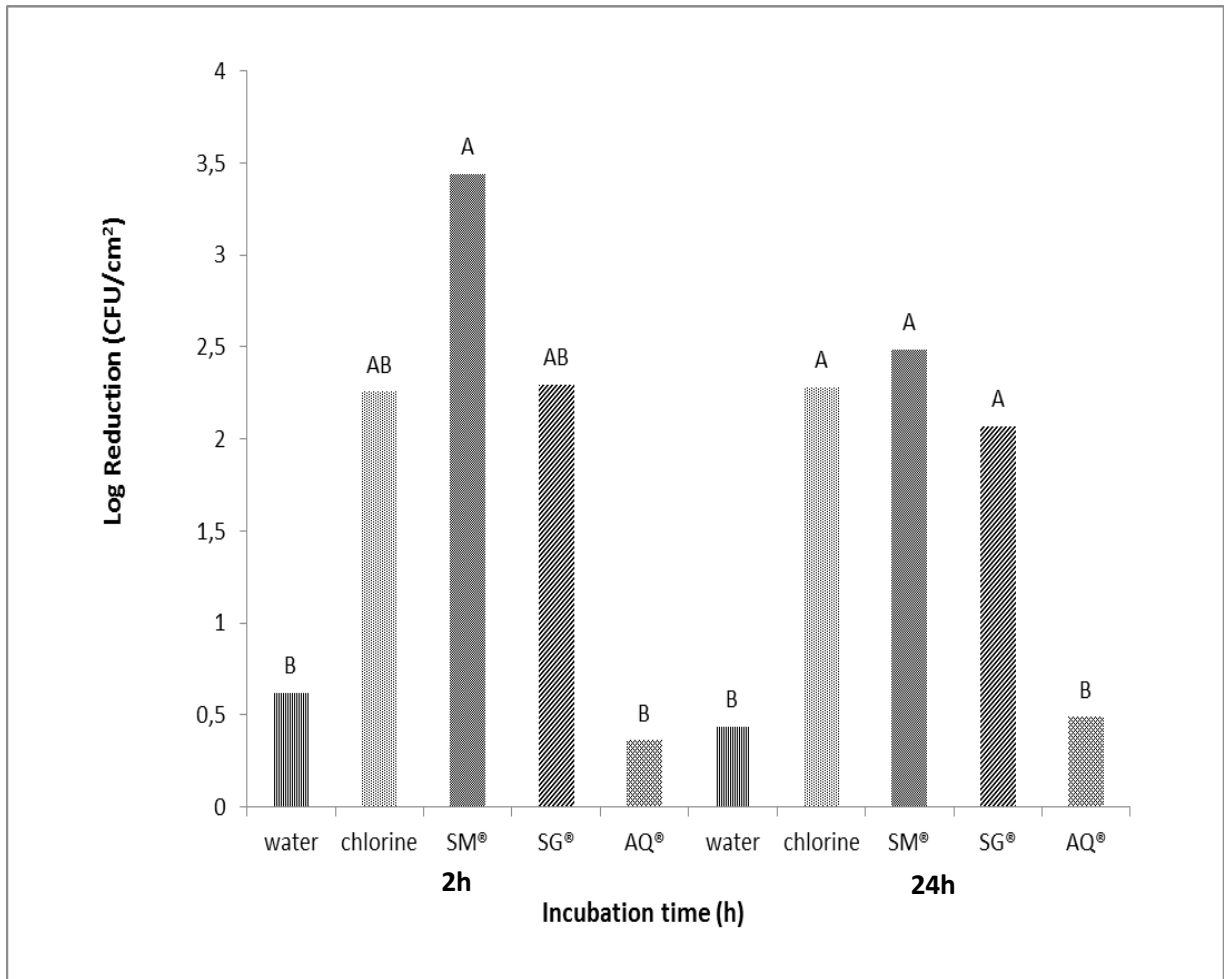





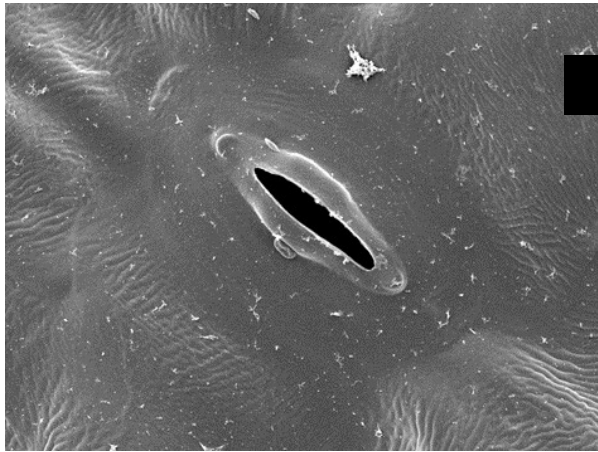
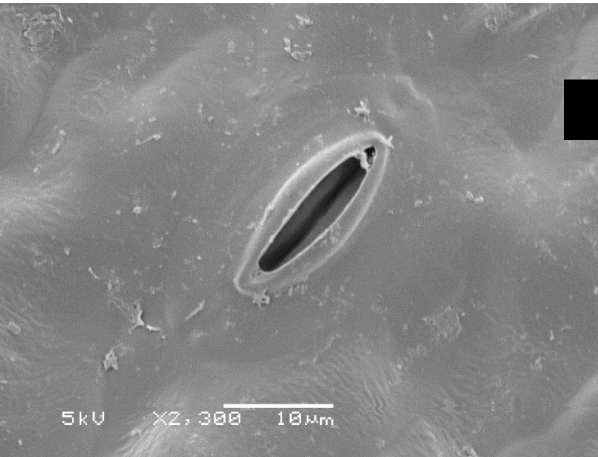
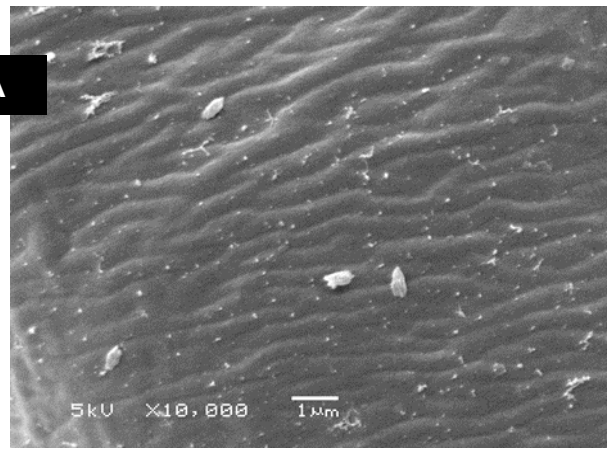


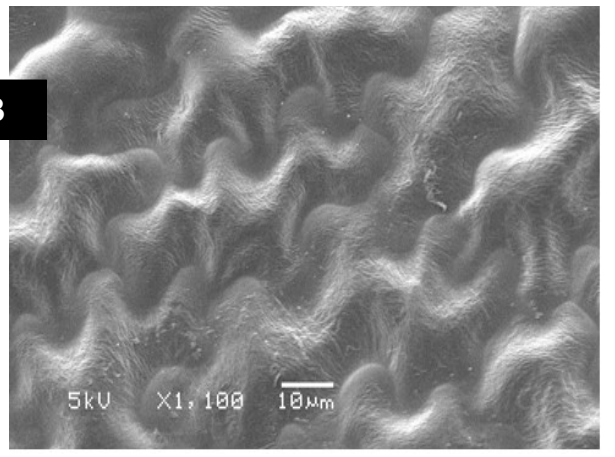
Figure 2. Effect of incubation time on the efficacy of sanitizing treatments on lettuce inoculated with *E. coli* where  water (1 min),  chlorine (200 mg/L / 15 min),  SM® (1% / 10 min),  SG® (1% / 10 min),  AQ® (2% / 10 min). Data represent means of three replicates.



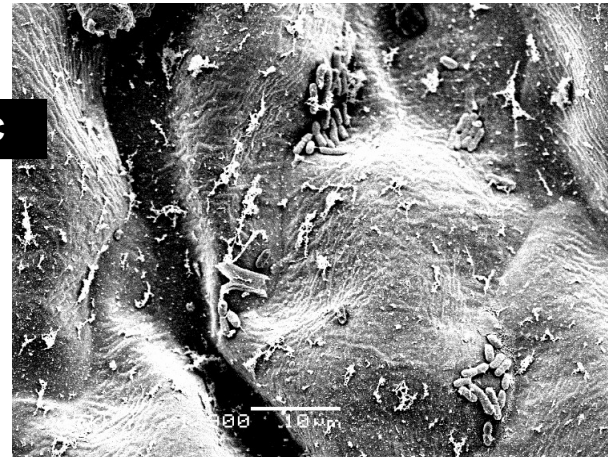
A



B



C



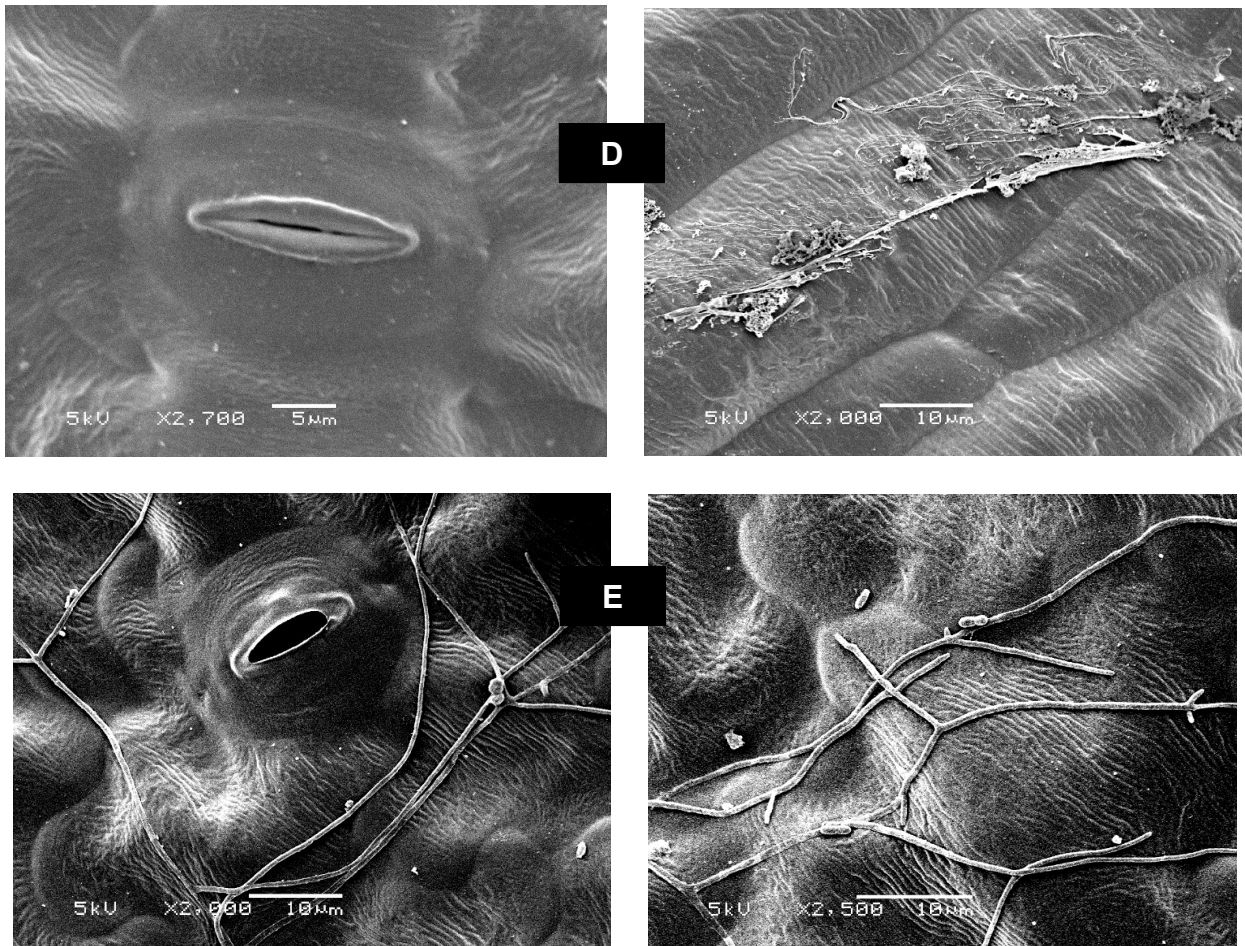
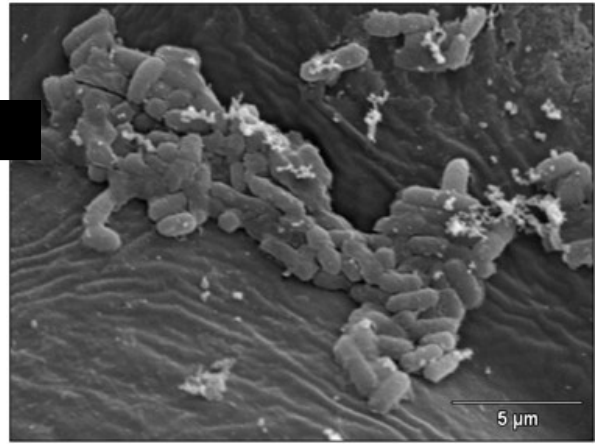
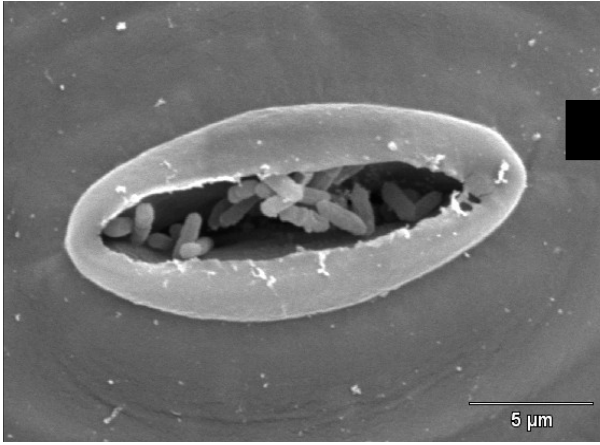
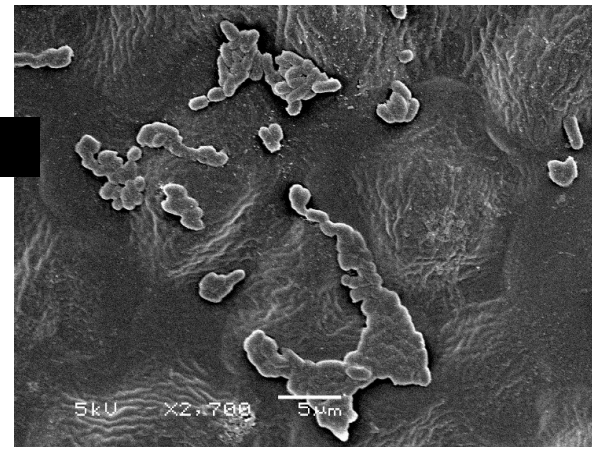
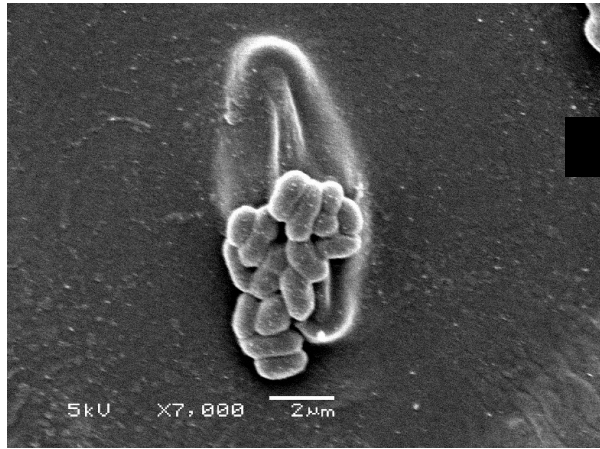


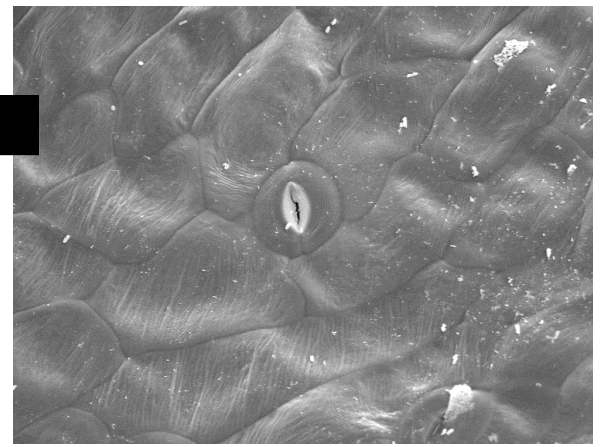
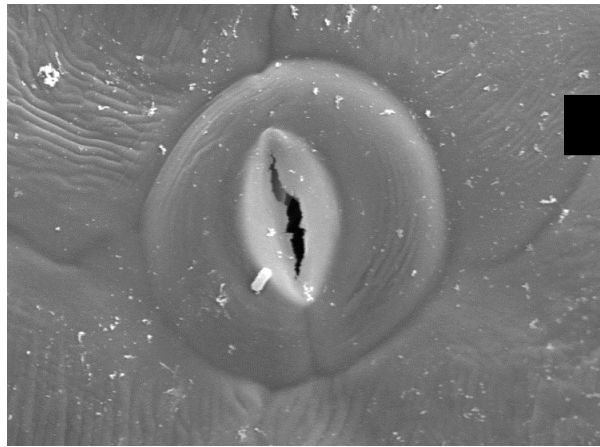
Figure 3: SEM images of *E.coli* ATCC 25972 attached to surfaces of lettuce leaves. (A) 2 h of incubation after inoculation, and the treatment with (B) water 1 min, (C) SM® (1%) for 10 min, (D) SG® (1%) for 10 min, (E) Chlorine (200 mg/mL) for 15 min at $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$



A



B



C

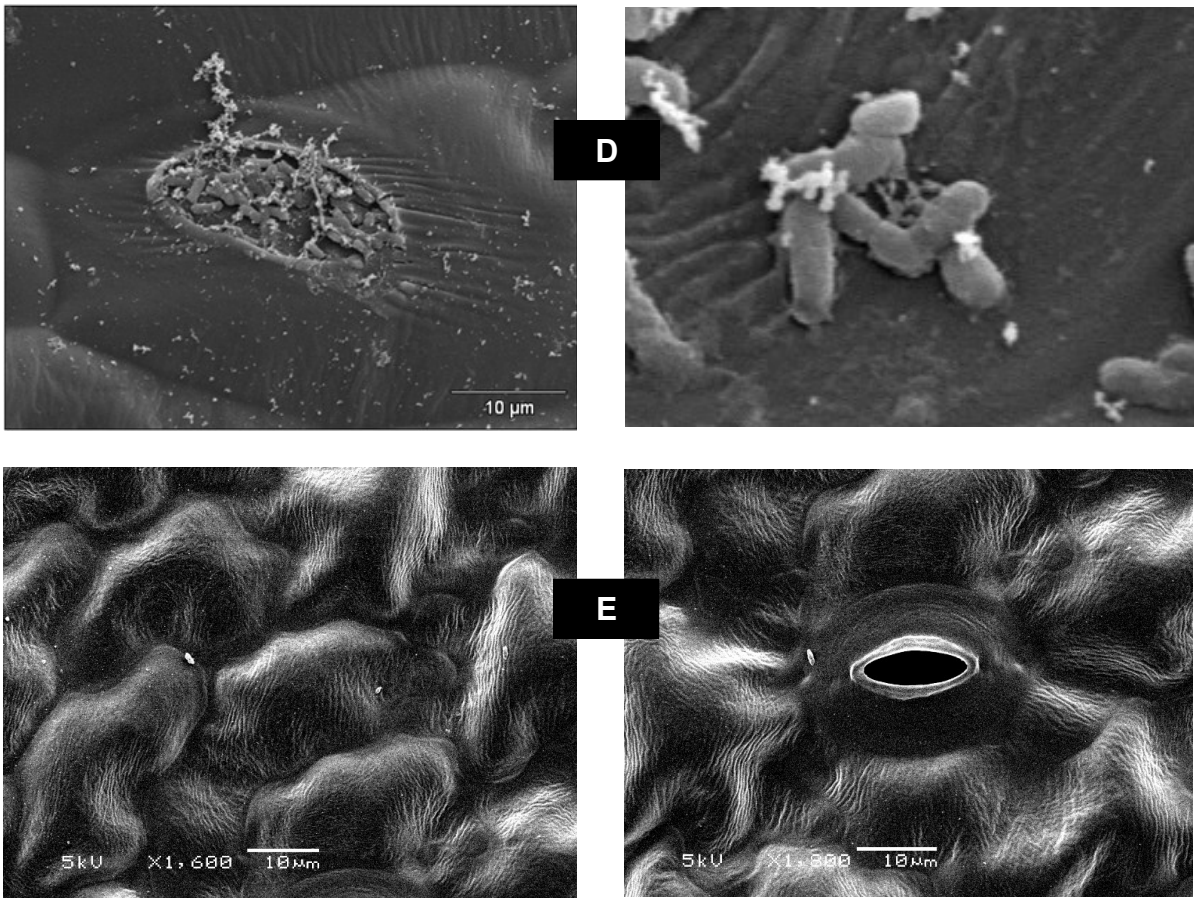


Figure 4: SEM images of *E. coli* ATCC 25972 attached to surfaces of lettuce leaves. (A) 24 h of incubation after inoculation, and the treatment with (B) water 1 min, (C) SM® (1%) for 10 min, (D) SG® (1%) for 10 min, (E) Chlorine (200 mg/mL) for 15 min at $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

References

- Akbas, M.Y., & Olmez, H. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 619–624.
- Arias, M. E., Gomeza, J.D., Cudmani, N.M., Vattuonec, M.A., & Isla, M.I. (2004). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. *Life Sciences*, 75 (2), 191–202.
- Aruscavage, D., Lee, K., Miller, S., & LeJeune, J.T. (2006). Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of Food Science*, 71 (8), 89-99.
- Baur, S., Klaiber, R., Wei, H., Hammes, W. P., & Carle, R. (2005). Effect of temperature and chlorination of pre-washing water on shelf-life and physiological properties of ready-to-use Iceberg lettuce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(2), 171-182.
- Beuchat, L. R., Farber, J. M., Garrett, E. H., Harris, L. J., Parish, M. E., Suslow, T. V., & Busta, F. F. (2001). Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1079–1084
- Beltrán, D., Selma, M. V., Tudela, J. A., & Gil, M. I. (2005). Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 37-46.
- Beltran-Heredia, J., Sánchez-Martin, J., Gómez-Muñoz, M. C. (2010). New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. *Chemical Engineering Journal*, 162 (3), 1019-1025.
- Borucki, M. K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–7342.
- Brandl, M. T. (2008). Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5285–5289
- Brasil (2007). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. *Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06*. Brasília. DF.
- Brasil. (2013) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos: Abril 2013
- Choi, M., Lee, S., Park, K., Chung, M., Ryu, S., & Kang, D. (2012). Effect of aerosolized malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce. *Food Control*, 24 (1-2), 171-176.

- Chae, M. S., & Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 103–111
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 421–464.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., & Finlay, B.B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (4), 822–880
- Center for Science in the Public Interest (CSPI). Outbreak Alert! 2009: Analyzing Foodborne Outbreaks, 1998 to 2007. (2009). <http://cspinet.org/new/pdf/outbreakalertreport09.pdf> (accessed Dec, 2014)
- FAO/WHO. Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables: meeting report, microbiological risk assessment series / FAO/WHO (2008).
- Friesema, I., Sigmundsdottir, G., van der Zwaluw, K., Heuvelink, A., Schimmer, B., de Jager, C., Rump, B., Briem, H., Hardardottir, H., Atladottir, A., Gudmundsdottir, E., & Van Pelt, W., (2008). An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September–October 2007. *Euro Surveillance* 13 (50).
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of action of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147–157.
- Gajraj, R., Pooransingh, S., Hawker, J.I., & Olowokure, B. (2012). Multiple outbreaks of *Salmonella* braenderup associated with consumption of iceberg lettuce. *International Journal of Environmental Health Research*, 22 (2), 150–155
- Gomes, C., Da Silva, P., Moreira, R. G., Castell-Perez, E., Ellis, E. A., & Pendleton, M. (2009). Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 238–247.
- Hernández, N..N.R.; Saucedo, S.A.; Cuéllar, A.C.; Álvarez, B.R.; & Moya, D.L. (2009). Actividad antimicrobiana de *Waltheria indoca* y *Acacia farnesiana*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40 (2), 129–134.
- Hua, G., & Reckhow, D. A. (2007). Comparison of disinfection by product formation from chlorine and alternative disinfectants. *Water Research*, 41, 1667–1678.
- Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y.; Konuma, H., & Kumagai, S. (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 present in radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1532–1535.
- Jahid, I. K., Han, N., & Ha, S. -D. (2014). Inactivation kinetics of cold oxygen plasma depend on incubation conditions of *Aeromonas hydrophila* biofilm on lettuce. *Food Research International*, 55, 181–189.
- Jahid, I. K., & Ha, S. -D. (2012). A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 299–316.

Keskinen, L.A., Burke, A., & Annous, B.A (2009). Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 132 (2-3), 134-140.

Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., & Sela, S. (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6076–6086

Lang, M. M., Harris, L. J., & Beuchat, L. R. (2004). Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. *Journal of Food Protection*, 67, 1092-1103

Mangrich, A.S.; Doumer, M.E.; Mallmann, A.S.; & Wolf, C.R. (2014). Química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de *Acacia mearnsii*. *Revista Virtual de Química*, 6 (1), 2-15.

McEgan, M., Danylyu, M.D., 2015. Evaluation of aqueous and alcohol-based quaternary ammonium sanitizers for inactivating *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on peanut and pistachio shells. *Food Microbiology*, 47, 93-98.

Nabi, O. M. A., Reisinger, E.C., Reinthaler, F.F., Still, F., Eibel, U., & Krejs, G.J. (1992). Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Del. var. *nilotica* (Mimosaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 37 (1), 77-79.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2007. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement. M100-S17, v.27, n.1.

Niemira, B.A., & Cooke, P.H. (2010). *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation on Romaine lettuce and spinach leaf surfaces reduces efficacy of irradiation and sodium hypochlorite washes. *Journal of Food Science*, 75 (5), 270-277.

Ölmez H, & Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT- Food Science and Technology*, 42 (3), 686-693.

Ölmez, H.; & Temur, S.D. (2010). Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 964-970.

Pires, D., Sillamkorva, S., Faustino, A., & Azeredo, J. (2011). Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Research in Microbiology*, 162 (8), 798-806.

Reed, P. E.; Finck, M. R.; U.S. Patent 5,659,002, 1997.

Sagong, H.; Lee, S.; Chang, P.; Heu, S.; Ryu, S.; Choi, Y.; & Kang, D. (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 287-292.

- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Seigler, D.S. (2003). Phytochemistry of Acacia- sensu lato. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 (8), 845 – 873.
- Shaw, R. K., Berger, C. N., Feys, B., Knutton, S., Pallen, M. J., & Frankel, G. (2008). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2908–2914
- Singer, P. C. (1994). Control of disinfection by-products in drinking water. *Journal of Environmental Engineering - ASCE (American Society of Civil Engineers)*, 120(4), 727–744.
- Smith, A.H.; Imlay, J.A.; & Mackie, R.I. (2003). Increasing the Oxidative Stress Response Allows *Escherichia coli* To Overcome Inhibitory Effects of Condensed Tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6), 3406–3411
- Söderström, A., Österberg, P., Lindqvist, A., Jönsson, B., Lindberg, A., Ulander, S.B., Welinder-Olsson, C., Löfdahl, S., Kaijser, B., De Jong, B., Kühlmann-Berenzon, S., Boqvist, S., Eriksson, E., Szanto, E., Andersson, S., Allestam, G., Hedenström, I., Muller, L.L., & Andersson, Y. (2008). A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5 (3), 339–349.
- Srey, S., Jahid, I.K., & Ha, S.D. (2012). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31 (2), 572-585.
- Srey, S.; Park, S.Y.; Jahid, I.K.; & Sang-Do H. (2014). Reduction effect of the selected chemical and physical treatments to reduce *L. monocytogenes* biofilms formed on lettuce and cabbage. *Food Research International*, 62, 484–491
- Takkinen, J., Nakari, U., Johansson, T., Niskanen, T., Siitonen, A., & Kuusi, M. (2005). A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella Typhimurium* in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005. *Euro Surveillance* 10 (6).
- Tanac S. A. Tanfloc Coagulant/flocculant vegetable origin. Practical Handbook, 1, 1-99, 2013.
- Trentin, D.S., Silva, D.B., Amaral, M.W., Zimmer, K.R., Silva, M.V., Lopes, N.P., Giordani, R.B., & Macedo, A.J. (2013). Tannins Possessing Bacteriostectic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *PLOS one*, 8 (6).
- Venter, P.B., Senekal, N.D., Kemp, g., Amra-Jordaan, M., Khan, P., Bonnet, S.L., & Westhuizen, J.H. (2012). Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 3: The chemical composition of wattle (*Acacia mearnsii*) bark extract. *Phytochemistry*, 83, 153–167
- Voravuthikunchai, S., Lortheeranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S., & Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Ethnopharmacology*, 94 (1), 49–54.

3.2 Artigo 2 – Effect of tannin extracts on quality of fresh cut crisp leaf lettuce

Artigo formatado conforme normas da Revista Ciência Rural.

Effect of tannin extracts on quality of fresh cut crisp leaf lettuce

Tâmmila Venzke Klug¹; Moises Segaspini¹; Júnia Novello^{2,3}; Amanda Moresco¹; Ana Raísa Paiva⁵, Alessandro Rios⁴; Eduardo Cesar Tondo³, Renar João Bender*¹

¹ Laboratório de Pós Colheita, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Centro de Ciências Exatas, Universidade de Caxias do Sul (UCS). Rua Francisco Getúlio Vargas, 1120, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

³ Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9.500, prédio 43212, Campos do Vale, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre/RS, Brazil.

⁴ Laboratório de Compostos Bioativos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9.500, prédio 43212, Campos do Vale, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre/RS, Brazil

⁵ Setor de Manutenção, Almoxarifado e Patrimônio (SEMAP), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9.500, prédio 43212, Campos do Vale, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre/RS, Brazil

* Corresponding author: Renar João Bender – E-mail: rjbe@ufrgs.br – (55 51) 3308-6064

Abstract

In the present study, tannin extracts (rinsed or not) were compared with the use of sodium hypochlorite and tap water with respect to their effect on equilibrium modified atmosphere packaged fresh cut crisp leaf lettuce. The effects of these sanitizers on total color difference, total titratable acidity and microbial levels of the product after sanitization and during storage (9 days at 3 °C) were evaluated. The rinsed SM® tannin extract resulted in similar results to those of chlorine solution for all the parameters analyzed and, furthermore, presented a high reduction in the initial bacterial count of minimally processed lettuce. However, during storing, the tannin extract didn't show better results than the use of tap water. Therefore, the tannin extract SM® could be used in washing water to attempt to reduce the initial microbiological load as to avoid cross contamination in minimally processing of vegetables.

Keywords: fresh cut lettuce; tannin extracts; postharvest storage

1. Introduction

The consumption of fresh vegetables is associated with the prevention of chronic diseases and with people's lifestyle changes, justifying its accelerated growth in the last few decades (Allende et al., 2009; Froder et al., 2007). Such growth is enhanced by practicality offered by minimally processed vegetables. They are washed, peeled, cut, disinfected, rinsed and packaged, making them ready for consumption ([Francis et al., 1999](#)).

At the present moment, lettuce (*Lactuca sativa* L.) is the most consumed leafy vegetable in Brazil, accounting for approximately 40% of the total sales volume of fresh produce supply companies (Sala and Costa, 2012). Nonetheless, linked to the consumption of fresh vegetables is the concern regarding the microbiological safety

of these products, potential contamination sources as a result of pathogenic bacteria (Anderson et al., 2011).

Sanitization techniques applied to minimally processed products target microbiological safety and extend the shelf life. Sanitizing with chlorinated products is recommended to reduce or eliminate the microbiological proliferation in minimally processed leafy green vegetables. Sodium hypochlorite is the most commonly used sanitizer because of the economic aspect. Yet, its use is questioned by reason of the formation of trihalomethanes resulting from the contact with organic matter (Ölmez and Kretzschmar, 2009).

The presence of organic matter can promote the formation of haloacetic acids, chloroform (CHCl₃) or other trihalomethanes (THM), all of which are known to be harmful to human health (Artés, Gómez, Aguayo, Escalona, & Artés-Hernández, 2009). In countries such as Germany, Denmark and Belgium, the use of chlorine is prohibited (Artes and Allende, 2005; Artes et al., 2009; Rico et al., 2007). Furthermore, chlorine-based compounds are corrosive and cause skin and respiratory tract irritations to food handlers (Alvaro et al., 2009; Fava et al., 2011; Pérez-Gregorio et al., 2011; Vandekinderen et al., 2009).

Safety and quality are important terms in the food industry. Recently, there has been great interest in to find alternative and/or more effective sanitization agents/methods that provides low energy costs, competitive cost, environment friendly, ensuring the safety microbiological an quality nutritional and sensory of food. (São José et al., 2014).

In this context, tannin have drawn attention due to biological and physiological properties (Chung et al., 2008). Several studies indicated *in vitro* bacteriostatic activity

against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus* of tannin extracts (Nabi et al., 1992; Arias et al., 2004; Voravuthikunchai et al., 2004; Hernández et al., 2009). These studies impart a scientific basis to support tannin extracts treatments as sanitizers for lettuce. Furthermore, tannin extracts are products rather inexpensive, easily formulated, environment friendly and the evaluation of tannin extracts as disinfectants of minimally processed lettuce constitutes a novel research area, but It is very important to assess the effect of new sanitizers in produce quality to confirm that they do not have any detrimental effect. Consequently, the present study intended to evaluate the effects of tannin extracts of *Acacia mearnsii* as alternatives to sodium hypochlorite to sanitize fresh cut lettuce.

2. Materials and methods

2.1 Preparation of tannin extracts and chroline solution

Two commercial samples containing tannin extracts of *Acacia mearnsii* De Wild., supplied by Tanac SA (Montenegro, RS) were used in the present study: Tanfloc SG® and Tanfloc SM® which consists of a mixture of condensed polyphenols, mainly flavan-3-4-diol with anionic charge and a small percentage of sugars and hydrolysable gums. These were supplied in liquid format containing either 32% or 27% active matter, respectively.

Tanfloc is a non-toxic low molecular weight, essentially vegetable. It is an organic cationic polymer that acts as a coagulant/flocculent agent for the treatment of water and wastewater (Tanac, 2013). It is obtained through a Mannich reaction of the tannin extract with an amine and an aldehyde molecule (Mangrich et al., 2014). The

main difference between Tanfloc SG and SM lies on pH, wherein the first presents a range of 1.3 – 2.3 and the latter of 0.7 – 1.2. This is mainly due to their application, such as proposed by the company (Tanac, 2013). The tannin extracts (SM and SG) were diluted with distilled water at a concentration of 1%.

The Chlorine solution was made immediately before use, by diluting 2.5% (v/v) sodium hypochlorite (Anhembi, Brazil) in sterile water to achieve the concentration of 200 mg/l. Before washing the produce, pH of the sodium hypochlorite solution was adjusted to 6.5 by adding citric acid. The concentration was verified with chlorine concentration tests strips (Ecolab, USA).

2.2 Preparation of lettuce samples

Crisp leaf lettuce were obtained from a producer of the rural area of Viamão, RS. Lettuce at horticultural maturity were manually harvested during the early hours of the day and transported by car to the Laboratory of Compostos Bioativos of the Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) in Porto Alegre. Just after arrival, the lettuce were transferred to 3°C for 1 h before processing. Damaged outer layers of leaves were removed and discarded from each lettuce. A sample of 150g of untreated lettuce leaves was retrieved before processing to determine initial microbial contamination levels of lettuce.

2.3 Treatment procedure

Lettuce leaf samples of about 2 kg each were washed with tap water for 1 minute and afterwards sanitized with the following treatment solutions: T1) control, tap water wash for 1 minute; T2) immersion for 15 minutes in 200 mg/L chlorine solution (NaClO); T3) immersion for 10 minutes in 1% (v/v) of SM® tannin extract at pH 2.4; T4) immersion for 10 minutes in 1% (v/v) SG® tannin extract at pH 2.6; T5) 10 minute immersion in 1% (v/v) SM® tannin extract at pH 2.4; and T6) immersion for 10 minutes in 1% (v/v) SG® tannin extract at pH 2.6.

Samples were washed in chilled (7° C) treatment solutions, using a 1/10 ratio (weight of product/volume of solution). Subsequently, the treatments T2, T3 and T4 were rinsed for 1 minute in tap water at 7° C using the same weight/volume ratio. As a final point in sample preparation the treated leaves were centrifuged at 690 rpm for 5 minutes with a domestic centrifuge to remove excess treatment solutions. Subsequently, 50 g of fresh-cut lettuce leaves were packed and sealed in 25 micrometer polypropylene bags with O₂ permeability of 7000 cm³.m⁻².d⁻¹, CO₂ permeability of 20000 cm³.m⁻².d⁻¹ and water vapor permeability of 1 g.m⁻².d⁻¹.

The atmosphere inside the packages was modified and thermosealed to an initial concentration of 5kPa oxygen, 15kPa carbon dioxide and nitrogen as balance with a Fastvac F200 Flash thermosealer. Samples were stored in a refrigerated display cabinet simulating retail settings. Quality evaluations were carried out on the day of experiment set up and after 5, 7 and 9 more days of storage at 3° C and 12-hour light exposure.

2.4 Color measurement

A Konica/Minolta chromameter, model CR – 400 was used to assess the color of the lettuce leaves. Considering color variations among lettuce leaves within the same packages, 9 readings per experimental unit were taken to ensure data reliability. The averages of L^* , a^* and b^* were used to determine the Total Color Difference (ΔE) via the following equation:

$$(\Delta E) = \sqrt{(a^*_f - a^*_i)^2 + (b^*_f - b^*_i)^2 + (L^*_f - L^*_i)^2} \quad (1)$$

where L^*_i is the L^* value at day of experimental set up and L^*_f the value of L^* at retrieval from storage at either 5, 7 or 9 days. Likewise befalls for a^*_i , a^*_f , b^*_i and b^*_f . The total color differences were ranked as ranging from small differences to very obvious color differences as cited by Goyeneche et al. (2014).

2.5 Total Titratable Acidity (TTA)

Total titratable acidity (TTA) was determined by titrating 10 g of a samples of homogenized lettuce, diluted in 75 mL of distilled water with 0.1 N NaOH to an end point of pH 8.1, as described by AOAC (2000). TTA was expressed as the units of citric acid (mg/100 g) on a fresh weight basis.

2.6 Texture measurement

The texture of the fresh-cut lettuce leaves was measured using a texturometer (TA.XT plus texture analyzer from Stable Micro Systems, Exponent Lite software) equipped with a 50 kg load cell. Lettuce texture is quite difficult to measure due to the heterogeneity of the sample surface, so it was necessary to evaluate the firmness of the stalk and the leaf separately. A cylindrical probe with a 2-mm diameter penetrated the sample at $1,67\text{mm s}^{-1}$ up to its rupture. The peak force during penetration is firmness. The results are expressed in grams (grams force) and calculated from the average of three determinations.

2.7 Microbiological analysis

The levels of total count of mesophilic microorganisms, total coliforms and *Escherichia coli* were determined through the microbiological analyzes. Three samples of 10 g of fresh-cut lettuce leaves obtained from the modified atmosphere packages were disposed aseptically in stomacher bags, diluted in 90 mL of 0.1% sterile peptone water (pH 7.4) and homogenized (Stomacher®, Davie, USA) for 30 s. Serial decimal dilutions in sterile peptone water (0,1%) and CFU counts were performed using the micro drop technique. One 10 μL drop was placed in the appropriate culture media and allowed to run down the plate as described in Pires et al. (2011). The total count of mesophilic cells was determined using Plate Count Agar (PCA, HiMedia, India) and 48 hour incubation at 37°C . Total coliforms were determined by culturing with Violet Red Bile (VRB, Acumedia, USA) and 24 hour

incubation at 37° C. *E. coli* was determined by culturing with Chromocult medium (Merck, Germany) and 24 hour incubation at 37° C. Microbial colonies were reported as log CFU/g (U.S. FDA, 2001).

2.8 Statistical analysis

Three replicates of each treatment and for each analysis period were prepared and of each and every sample three subsamples were analyzed summing up to 27 values per day/treatment/variable. Data were analyzed as completely randomized blocks using the Statistical Analysis System Enterprise Guide 6.1, model Proc-Mixed. Averages were compared by Tukey test to determine differences at $\alpha=0.05$.

3 Results

3.1 Total color difference

Color changes were calculated according to Goyeneche et al. (2014). The authors suggested a ranking of visual changes that vary from almost imperceptible changes up to very obvious changes of color.

According to the classification proposed by Chen and Majumdar (2008), the color differences observed in Iceberg lettuce during the nine days of refrigerated storage vary from appreciable color differences (values ranging from 3.1 to 6.0) to large differences color (values ranging from 6.1 up to 12.0). Lettuce treated with the tannin extract SM® (T3) and followed by rinsing the leaves afterwards at the end of the experiment were ranked as of appreciable color differences. That treatment was statistically different from the water treatment, though not statistically different from all

the other treatments on the ninth day (Figure 1). Lettuce treated either with sodium hypochlorite (T2), or with the tannin extracts SM® (T3) and SG® (T4) presented color changes up to the last day of storage categorized as appreciable color differences. Lettuce treated either with only water (T1) or with the tannin extract SM® (T5) and SG® (T6) without subsequent rinsing were categorized as presenting large differences of color.

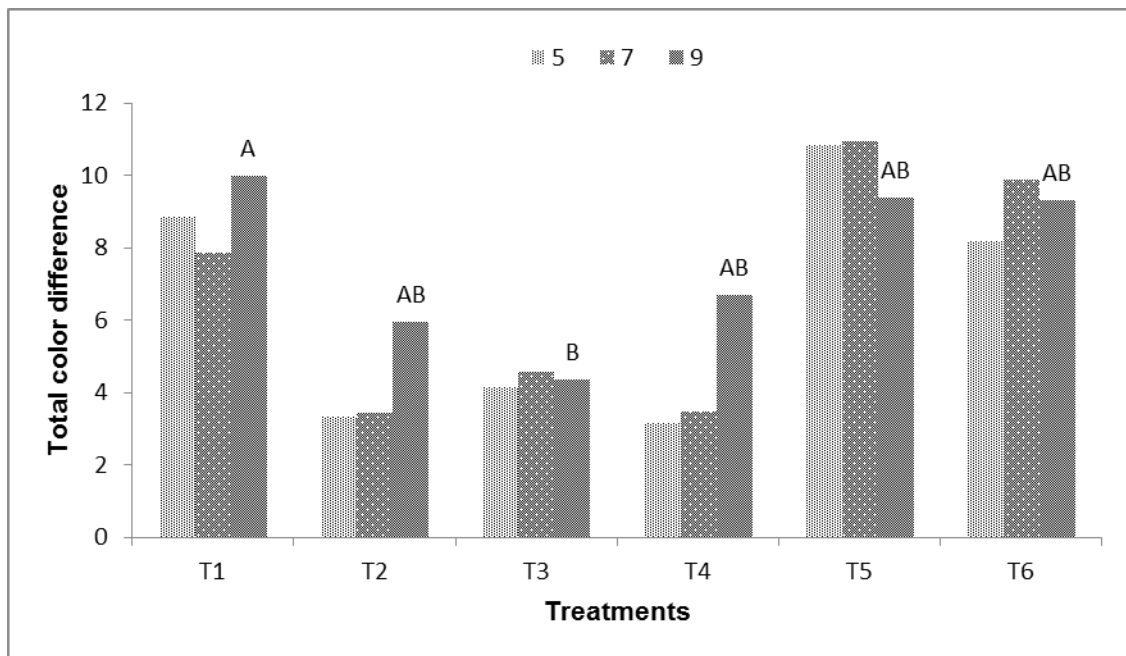


Figure 1: Total color difference of fresh cut crisp leaf lettuce sanitized with different products and stored for up to 9 days at $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. T1 - tap water/1 min; T2 - Sodium hypochlorite ($200\text{ mg L}^{-1}/15\text{ min}$); T3 - SM ($1\%/10\text{ min}$); T4 - SG ($1\%/10\text{ min}$); T5 - SM ($1\%/10\text{ min/not rinsed}$); T6 - SG ($1\%/10\text{ min/not rinsed}$).

3.2 Titratable acidity

The titratable acidity determined from the juice extracted from lettuce leaves had a general tendency of decreasing the percentages of acids during 9 days at 3° C (Figure 2). After nine days, the treatments did not differ anymore in titratable acidity.

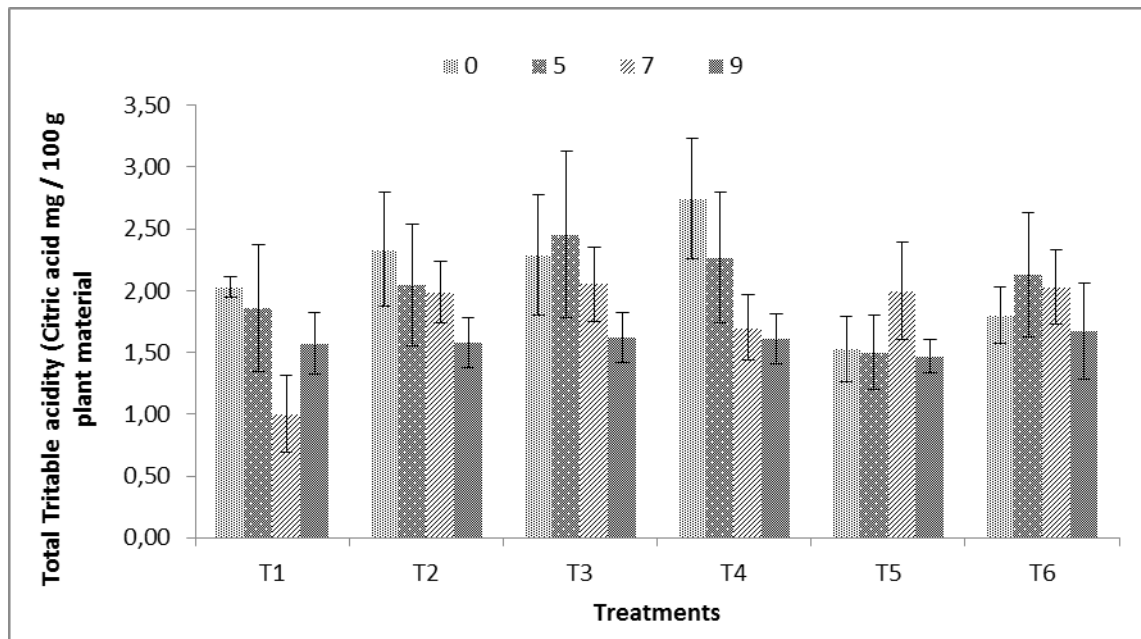


Figure 2: Titratable acidity in fresh-cut crisp leaf lettuce sanitized with different products and stored for up to 9 days at 3 °C ± 1 °C. T1 - tap water/1 min; T2 - Sodium hypochlorite (200 mg L⁻¹/15 min); T3 - SM (1%/ 10 min); T4 - SG (1%/10 min); T5 - SM (1%/10 min/not rinsed); T6 - SG (1%/10 min/not rinsed).

3.3 Texture

The values of the stalk's texture of the minimally processed lettuce samples do not display a tendency over the storage time. There is some variation, though not significantly different (Figure 3).

Regarding the values of firmness of the minimally processed lettuce leaves variation is even stronger. The control treatment (only water) and the tannin extracts

SM® (T5) and SG® (T6) when not rinsed after treatment application showed very low firmness (Figure 4). So far, there is no clear indication as to what could have caused such high variation besides the fact that firmness (penetrometer tests) should not be considered sufficiently precise to determine firmness changes in leafy vegetables.

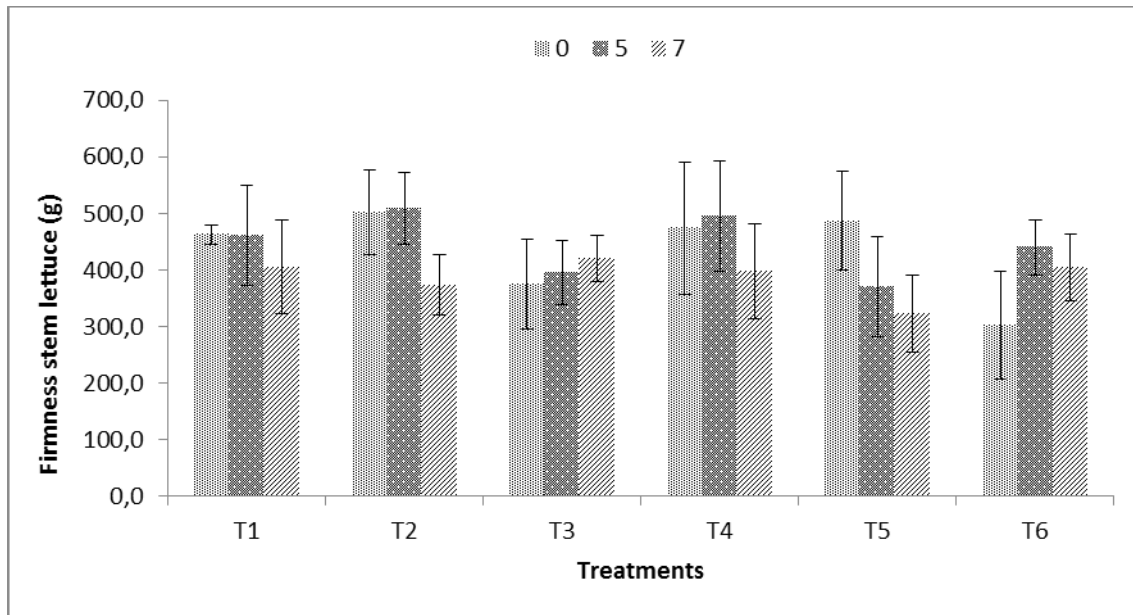


Figure 3: Firmness (g) of the fresh-cut crisp leaf lettuce stalk sanitized with different products and stored for up to 9 days at $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. T1 - tap water/1 min; T2 - Sodium hypochlorite (200 mg L^{-1} /15 min); T3 - SM (1%/ 10 min); T4 - SG (1%/10 min); T5 - SM (1%/10 min/not rinsed); T6 - SG (1%/10 min/not rinsed). Vertical bars indicate standard deviation

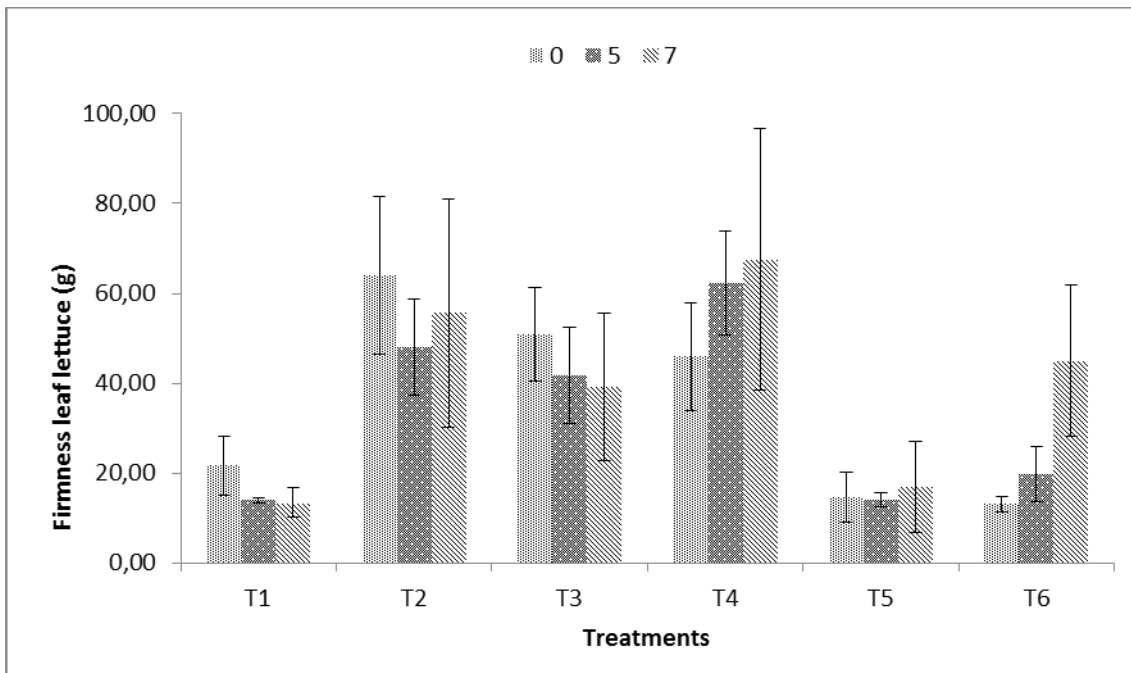


Figure 4: Firmness (g) of the fresh-cut crisp leaf lettuce leaf sanitized with different products and stored for up to 9 days at $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. T1 - tap water/1 min; T2 - Sodium hypochlorite ($200\text{ mg L}^{-1}/15\text{ min}$); T3 - SM ($1\%/10\text{ min}$); T4 - SG ($1\%/10\text{ min}$); T5 - SM ($1\%/10\text{ min}$ /not rinsed); T6 - SG ($1\%/10\text{ min}$ /not rinsed). Vertical bars indicate standard deviation

3.5 Microbiological analysis

The presence of *E. coli* was always below the detection limits (1 log cfu g^{-1}) after 9 d of storage, independently of the washing solution.

The initial mesophilic load on the unwashed lettuce leaves was in between 6 to 7 log cfu/g. There was a decrease of about 1.86 to 4.41 log cfu/g in total counts of mesophiles amongst treated samples and the initial load at day 0 (Figure 5). A higher initial reduction of 4.4 log cfu/g was observed by the treatment T3 and the lowest reduction was determined by only tap water washing (T1). The T2 and T3 treatments

successfully suppressed bacterial growth in the first 5 days of storage, showing a significantly different results from other treatments at day 5 ($P < 0.05$).

During storage, mesophilic microorganisms expanded rapidly reaching counts ranging from 4.8 to 6.3 log cfu/g. After nine days of storage, the differences in total counts of mesophiles were not significant anymore. (Figure 5).

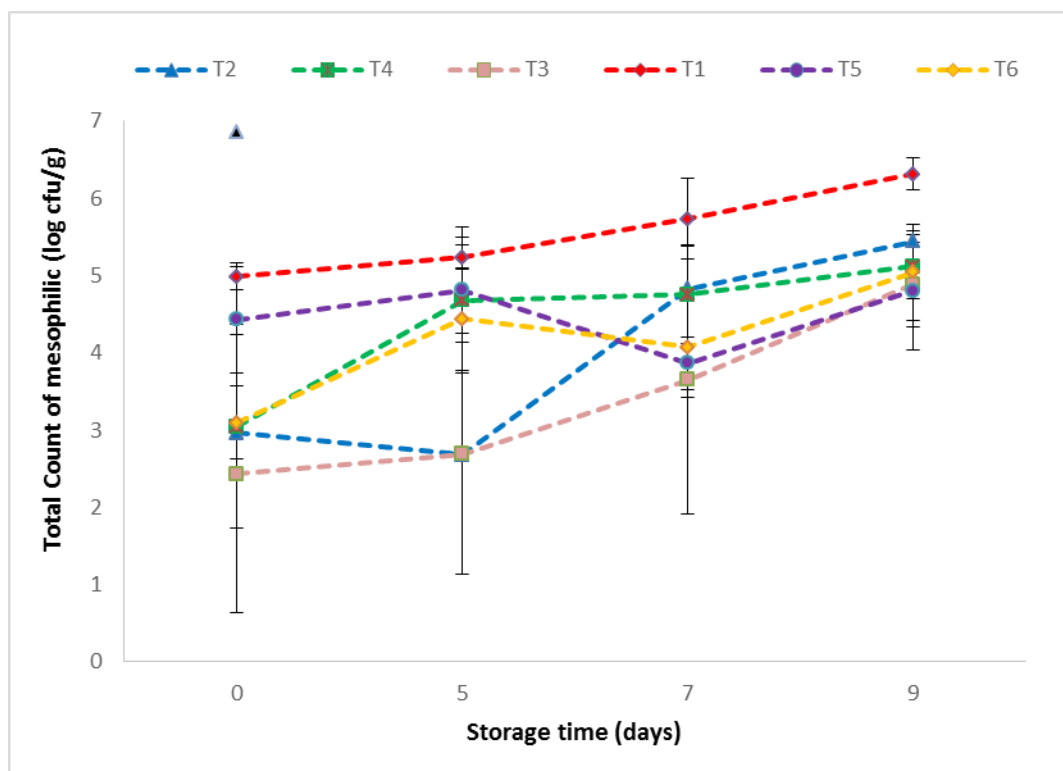


Figure 5: Counts of mesophilic aerobic microorganisms (log cfu/g) in fresh-cut crisp leaf lettuce sanitized with different products and stored for up to 9 days at $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. T1 - tap water/1 min; T2 - Sodium hypochlorite ($200\text{ mg L}^{-1}/15\text{ min}$); T3 - SM (1%/ 10 min); T4 - SG (1%/10 min); T5 - SM (1%/10 min/not rinsed); T6 - SG (1%/10 min/not rinsed). Vertical bars indicate standard deviation

The initial count of total coliforms was around 4 and 5 log cfu/g. Immediately after washing with the sanitizers, total coliforms also showed a reduction for all treatments in colony forming units. The greatest observed reduction of 4.47 log was observed when T4 treatment had been applied as sanitizers (Figure 6). At day 0, the treatment water showed the highest count, significantly different from all the other treatments ($P < 0.05$). Final levels of total coliforms after 9 days of storage were between 2.6 and 4.53 log cfu/g.

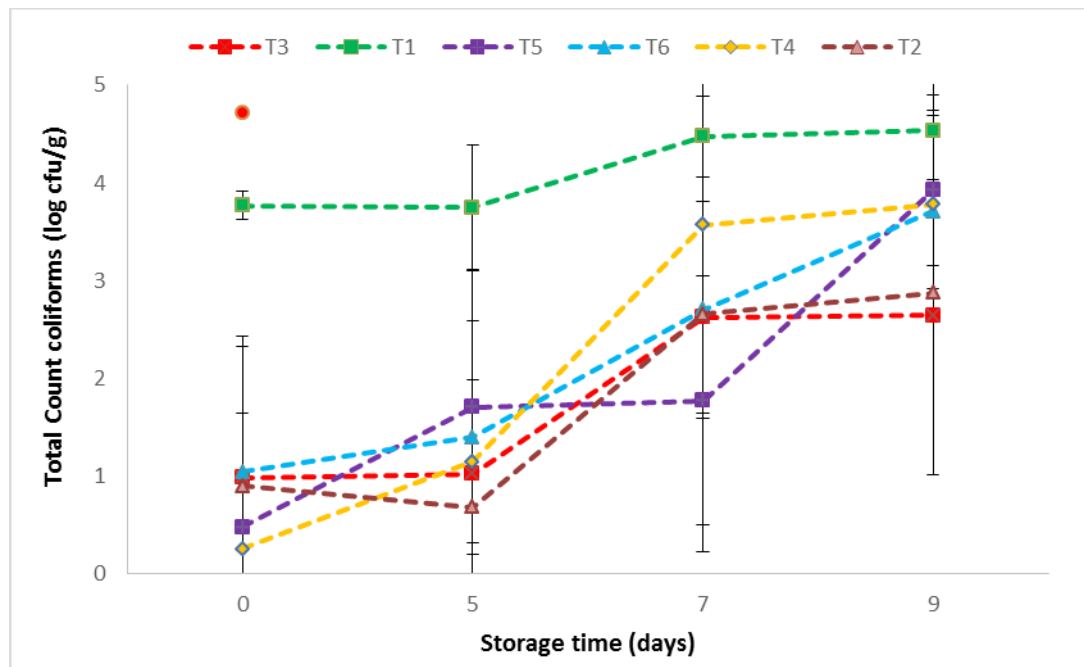


Figure 6: Counts of total coliforms (log cfu/g) in fresh-cut crisp leaf lettuce sanitized with different products and stored for up to 9 days at $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. T1 - tap water/1 min; T2 - Sodium hypochlorite ($200\text{ mg L}^{-1}/15\text{ min}$); T3 - SM ($1\%/10\text{ min}$); T4 - SG ($1\%/10\text{ min}$); T5 - SM ($1\%/10\text{ min/not rinsed}$); T6 - SG ($1\%/10\text{ min/not rinsed}$). Vertical bars indicate standard deviation

4. Discussion

The color of minimally processed vegetables is of foremost importance. Consumer acceptance is guided by visual appearance. The color changes evaluated in the present experiment for iceberg lettuce indicate that the treatment in which tannin extracts SM® and SG® and chlorine had been applied did not vary over storage time. Color changes remained in the ranking of appreciable difference. From those results it is possible to conclude that different tannin extracts and chlorine had little effect on color changes during 9 days of storage at 3° C for fresh cut lettuce. Baur et al. (2004) discussed that fresh cut-lettuce samples represent a heterogeneous formation of different tissues, which validate relatively large standard errors and the small color differences amongst treatments.

However, the treatments in which the tannin extracts were not rinsed off after treatment application, color changes were categorized as large difference. This situation suggests that the tannin extracts do influence negatively tissue color so that rinsing is a recommended procedure. As to what is the main cause of that effect of tannin on tissue color there are some indications. Since pH of the solution is in the range of 2.5, a circumstance that possibly affects tissue metabolism both at cell wall and internally at the level of organelles, such as the chloroplasts.

Texture is one of the quality parameters that help to determine the freshness of fresh produce (Almenar et al., 2008). Texture determinations both on the stalks and on leaf blades presented high variation in the present experiment. Toole et al. (2000) concluded that the relative position of vascular tissues (either parallel, oblique or perpendicular) in relation to the texturometer's blades has a direct effect on the values of the texture measurements. The authors as well indicate that lettuce leaves

are composed of two types of tissues: vascular and photosynthetic. Both are of an irregular distribution challenging visual differentiation. Therefore, consumer tests seem necessary to better evaluate the consumer acceptance of the texture of minimally processed lettuce to which tannin extracts had been applied to.

The T3 and T6 treatments in the evaluation of the stalk's texture and the T4, T5 and T6 in the evaluation of the lettuce leaf's texture showed an increase in the value of the texture at the end of storage. Rico et al. (2008) observed similar results after application of neutral electrolysed water with a concentration of 120mg/L of free chlorine in minimally processed lettuce after 7 days of storage at 4 °C. This increase in the texture values at the end of storage is to be associated, according to the authors to loss of water, i. e., dehydration of the tissues and consequently enhancing its elasticity.

Chlorine treatments of 200 mg/L for about 15 min resulted in decrease in lettuce texture after 9 days of storage. That result is not in agreement with the results stated by Manolopoulou et al. (2010). The authors observed that sanitizing lettuce with 100 mg chlorine/L for 2 min resulted in an increase in texture over storage period.

The initial levels of mesophilic bacteria (6- 7 log) were in the range expected in fresh-cut produce (Nguyen-the and Carlin, 1994). Mesophilic bacteria are around 10^3 – 10^9 CFU/g in raw vegetables after harvest, depending on the produce and the growing conditions (Oliveira et al., 2010; Zagory, 1999). Lopes-Galvez et al. (2010) reported reduction (1.3 – 1.7 log) using sodium hypochlorite at a concentration of 100 mg/L for 1 min, than that obtained in the present study using 200 mg/L for 15 min (1.9

log). Bachelli et al. (2013) also reported reduction of 2-3 log using sodium hypochlorite (150 mg/L) for 15 min in fresh cut lettuce.

At day 7, an increase in total count of mesophilic cells was observed for all treatments; that might be due to tissue damage, availability of O₂ inside the packages, or the presence of moisture and nutrients on produce surfaces that support microbial growth as related by Salgado et al. (2014). In relation to total count of coliforms, Berbari et al. (2001) declared that a population of total coliforms about 10⁵ (5 log) most probable number.g⁻¹, corresponded to high contamination levels of these microorganisms in the product. Data obtained in the present experiment did not exceed 10⁵ (5 log cycles) (Figure 6).

It is important to consider that regardless of the initial reduction achieved after the treatments, microbial populations of total count of mesophilic bacteria and total coliforms increased gradually during storage time (Figures 5 and 6). This phenomenon has been previously described by several authors, who suggested that microbial populations of ready to eat vegetables could increase faster and even reach an equal or higher number after disinfection (Gómez-López et al., 2013; Artés-Hernández et al., 2009). Also in accordance to the data gathered in the present study, Allende et al. (2008) observed that bacterial count at the end of storing was similar to the count obtained when the product was washed with tap water or with sanitizing solutions.

We can also consider that the tannin extracts and chlorine produced results similar to those of the tap water washing Iceberg lettuce during the nine days of refrigerated storage, so, the tannin extracts are not suitable for shelf-life extension, but could be used for cross-contamination avoidance during fresh-cut lettuce

processing (used in washing water) as observed by Allende et al. (2008), since they presented high initial reductions in the populations of mesophiles and total coliforms and in addition not affect the quality of the product.

The microbiological hygiene quality achieved using sodium hypochlorite analyzed by total count of mesophilic cells, total coliforms and *E coli*, was not better than the ones presented by lettuce samples sanitized using tannin extract SM®. This fact may be due to the fact that the tannin SM® is concocted by Mannich reaction, which makes this tannin extract connected to a quaternary ammonium compound. Quaternary ammonium compounds are reported to have antibacterial properties (McEgan and Danyylu, 2015). In addition, the effect of low pH solution of SM® might contribute to that antibacterial action.

5. Conclusions

Microbiological and quality analyses indicate that the application of the tannin extract SM® (T3) results is similar results to hypochlorite treatment (T2). Nonetheless, SM® (T3) does not ameliorate shelf life in comparison to the use of tap water (T1) on minimally processed lettuce leaves stored under modified atmosphere. Tannin extracts might turn out to be alternatives to chlorine as sanitizing media in view of the fact that they are rather inexpensive, easily formulated and do not give off potential carcinogenic residues. Therefore, the tannin extract SM® (T1) could be used in washing water to attempt to reduce the initial microbiological load as to avoid cross contamination in minimally processing of vegetables.

The lack of knowledge on harmfulness of tannin after continuous intake compels further studies to ascertain the appropriateness of this natural extract for fresh-cut produce sanitization.

References

- ANDERSON, M., JAYKUS, L.A., BEAULIEU, S., DENNIS, S. Pathogen–produce pair attribution risk ranking tool to prioritize fresh produce commodity and pathogen combinations for further evaluation (P³ARRT). **Food Control**. 22, 1865–1872, 2011
- ALVARO, J. E., MORENO, S., DIANEZ, F., SANTOS, M., CARRASCO, G., & URRESTARAZU, M. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. **Journal of Food Engineering**, 95(1), 11-15, 2009
- ALLENDE, A., SELMA, M.V., LÓPEZ-GÁLVEZ, F., VILLAESCUSA, R., GIL, M.I. Role of comercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality os fresh cut escarole and lettuce. **Postharvest Biology and Technology**. 49, 155-163, 2008.
- ALLENDE, A., MCEVOY, J., TAO, Y., LUO, Y. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on Escherichia coli O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. **Food Control**. 20(3), 230–234, 2009.
- AOAC. (2000). Official Method of Analysis of AOAC International (17th ed.).
- ARTÉS-HERNÁNDEZ, F., ESCALONA, V.H., ROBLES, P.A., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G.B., ARTÉS, F. Effect of UV-C radiation on quality of minimally processed spinach leaves. **J. Sci. Food Agric**. 89, 414–421, 2009.
- ARTES, F., ALLENDE, A. Processing lines and alternative preservation techniques to prolong the shelf-life of minimally fresh processed leafy vegetables. **European Journal of Horticultural Science**. 70(5), 231-245, 2005.
- ARTES, F., GOMEZ, P., AGUAYO, E., ESCALONA, V., ARTES-HERNANDEZ, F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**. 51(3), 287-296, 2009.
- ARIAS, M.E., GOMEZ, J.D., CUDMANI, N.M., VATTUONE, M.A., ISLA, M.I. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of Acacia aroma Gill. ex Hook et Arn. **Life Sciences**. 75, 191–202, 2004.

ALMENAR, E., SAMSUDIN, H., AURAS, R., HARTE, B., & RUBINO, M. Postharvest shelflife extension of blueberries using a biodegradable package. **Food Chemistry**. 110, 120–127, 2008.

BAUR, S., KLAIBER, R., HAMMES, W., & CARLE, R. Sensory and microbial quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 5, 45-55, 2004.

BACHELLI, M.L.B., AMARAL, R.D.A., BENEDETTI, B.C. Alternative sanitization methods for minimally processed lettuce in comparison to sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology**. 44, 3, 673-678, 2013.

BERBARI, S.A.G., PASCHOALINO, J.E., SILVEIRA, N.F.A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciênc Tecnol Aliment**. 21, 197-201, 2001.

CHEN, X. D., MAJUMDAR, A. **Drying Technologies in Food Processing**. Blackwell Publishing Ltd., p. 26–29, 2008.

CHUNG, K.T., WONG, T.Y., WEI, C.I., HUANG, Y.W., LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Crit. Rev. Food Sci Nutr**. 38, 421-464, 2008.

FAVA, J., HODARA, K., NIETO, A., GUERRERO, S., ALZAMORA, S. M., & CASTRO, M. A. Structure (micro, ultra, nano), color and mechanical properties of *Vitis labrusca* L. (grape Berry) fruits treated by hydrogen peroxide, UV-C irradiation and ultrasound. **Food Research International**, 44(9), 594-595, 2011.

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

FRODER, H., MARTINS, C. G., DE SOUZA, K. L. O., LANDGRAF, M., FRANCO, B., DESTRO, M. T. Minimally processed vegetable salads: Microbial quality evaluation. **Journal of Food Protection**, 70(5), 1277–1280, 2007.

HERNÁNDEZ, N.N.R., SAUCEDO, S.A., CUÉLLAR, A.C., ÁLVAREZ, B.R., MOYA, D.L. Actividad antimicrobiana de *Waltheria indoca* y *Acacia farnesiana*. **Revista CENIC Ciências Biológicas**, 40 (2), 129-134, 2009.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.M., MARÍN, A., MEDINA-MARTÍNEZ, M.S., GIL, M.I., ALLENDE, A. Generation of trihalomethanes with chlorine-based sanitizers and impact on microbial, nutritional and sensory quality of baby spinach. **Postharvest Biology and Technology** 85, 210-217, 2013.

GOYENECHEA, R., AGÜEROA, M. V., ROURAA, S., DI SCALA, K. Application of citric acid and mild heat shock to minimally processed sliced radish: Color evaluation. **Postharvest Biology and Technology**. 93, 106–113, 2014.

- LOPEZ-GALVEZ, F., ALLENDE, A., TRUCHADO, P., MARTINEZ-SANCHEZ, A., TUDELA, J.A., SELMA, M.V., GIL, M.I. Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh cut lettuce while avoiding by-product formation. **Postharvest Biol. Technol.** 55, 53–60, 2010.
- MANGRICH, A.S., DOUMER, M.E., MALLMANN, A.S., WOLF, C.R. Química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de *Acacia mearnsii*. **Revista Virtual de Química.** 6 (1), 2-15, 2014.
- MANOLOPOULOU, H., LAMBRINOS, G., CHATZIS, E., XANTHOPOULOS, G., ARAVANTINOS, E. Effect of temperature and modified atmosphere packaging on storage quality of fresh-cut romaine lettuce. **Journal of Food Quality.** 33, 317- 336, 2010.
- MCEGAN, M., DANYYLU, M.D. Evaluation of aqueous and alcohol-based quaternary ammonium sanitizers for inactivating *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on peanut and pistachio shells. **Food Microbiology,** 47, 93-98, 2015.
- NABI, O. M. A., REISINGER, E.C., REINTHALER, F.F., STILL, F., EIBEL, U., KREJS, G.J. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L.)Willd. ex Del. var. *nilotica* (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology,** 37 (1), 77-79, 1992.
- NGUYEN-THE, C., CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 34, 371–401, 1994.
- OLIVEIRA, M., USALL, J., VIÑAS, I., ANGUERA, M., GATIUS, F., ABADIAS, M. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology,** 27(5), 679–684, 2010.
- ÖLMEZ, H., KRETZSCHMAR, U. Potential alternative methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT Food Sci. Technol.** 42, 686–693, 2009.
- PÉREZ-GREGORIO, M. R., GONZÁLEZ-BARREIRO, C., RIAL-OTERO, R., & SIMAL-GÁNDARA, J. Comparison of sanitizing technologies on the quality appearance and antioxidant levels in onion slices. **Food Control,** 22(12), 2052 – 2058, 2011.
- PIRES, D., SILLANKORVA, S., FAUSTINO, A., AZEREDO, J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. **Research in Microbiology,** 162(8), 798–806, 2011.
- RICO, D., MARTÍN-DIANA, A. B., BARAT, J. M., BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology,** 18(7), 373-386, 2007.

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

SALA, F.C., COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Hortic. Bras.** 30, 187–194, 2012.

SALGADO, S.P., PEARLSTEIN, A.J., LUO, Y., FENG, H. Quality of Iceberg (*Lactuca sativa* L.) and Romaine (*L. sativa* L. var. *longifolia*) lettuce treated by combinations of sanitizer, surfactant, and ultrasound. **Food Science and Technology**. 56, 261-268, 2014.

SÃO JOSÉ, J.F.B., ANDRADE, N.J., RAMOS, A.M., VANETTI, M.C.D., STRINGHETA, P.C., CHAVES, J.B.P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, 45, 36-50, 2014.

TANAC S. A. **Tanfloc Coagulant/flocculant vegetable origin**. Practical Handbook, 1, 1-99, 2013.

TOOLE, G. A., PARKER, M. L., SMITH, A. C., WALDRON, K. W. Mechanical properties of lettuce. **Journal of Material Science**. 35, 3553–3559, 2000.

U.S. FDA. (2001). Bacteriological analytical manual online. Available from <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>. Accessed 05.02.14

VANDEKINDEREN, I., CAMP, J. V., DE MEULENAR, B., VERAMME, K., BERNAERT, N., DENON, Q., et al. Moderate and high doses of sodium hypochlorite, neutral electrolyzed oxidizing water, peroxyacetic acid, and gaseous chlorine dioxide did not affect the nutritional and sensory qualities of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* var, *capitata* L.) after washing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(10), 4195- 4203, 2009.

VORAVUTHIKUNCHAI, S., LORTHEERANUWAT, A., JEEJU, W., SRIRIRAK, T., PHONGPAICHIT, S., SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Ethnopharmacology**, 94 (1), 49–54, 2004.

ZAGORY, D. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. **Postharvest Biology and Technology**, 15(3), 313–321, 1999.

Statistical analysis

Total Count of aerobic mesophilic (log cfu/g)

| | 0 | | 5 | | 7 | | 9 | |
|---------------------|----------|------------|----------|-------------|----------|--------------|----------|------------|
| Water (T1) | 4,99 | A a | 5,24 | A a | 5,74 | A a | 6,32 | A a |
| Chlorine (T2) | 2,97 | B a | 2,68 | B a | 4,83 | AB b | 5,44 | A b |
| SM® (T3) | 2,43 | B a | 2,69 | B a | 3,65 | B ab | 4,88 | A b |
| SG® (T4) | 3,05 | B a | 4,68 | A ab | 4,76 | AB ab | 5,12 | A b |
| SM® not rinsed (T5) | 4,43 | A a | 4,81 | A a | 3,87 | B a | 4,81 | A a |
| SG® not rinsed (T6) | 3,10 | B a | 4,44 | A ab | 4,08 | AB ab | 5,04 | A b |

Different letters in column (A,B,C) and in rows (a,b,c) indicate significant differences among treatments according to Tukey's test with a P value of 0.05.

Total count of coliforms (log cfu/g)

| | 0 | | 5 | | 7 | | 9 | |
|---------------------|----------|------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|------------|
| Water (T1) | 3,77 | A a | 3,75 | A a | 4,48 | A a | 4,53 | A a |
| Chlorine (T2) | 0,90 | B a | 0,68 | B a | 2,66 | AB a | 2,88 | A a |
| SM® (T3) | 0,98 | B a | 1,02 | B a | 2,62 | A a | 2,64 | A a |
| SG® (T4) | 0,25 | B a | 1,14 | B a | 3,57 | AB b | 3,78 | A b |
| SM® not rinsed (T5) | 0,48 | B a | 1,71 | AB ab | 1,77 | B ab | 3,92 | A b |
| SG® not rinsed (T6) | 1,04 | B a | 1,40 | B a | 2,70 | AB ab | 3,70 | A b |

Different letters in column (A,B,C) and in rows (a,b,c) indicate significant differences among treatments according to Tukey's test with a P value of 0.05.

Total Titratable acidity (Citric acid mg/100g plant material)

| | 0 | | 5 | | 7 | | 9 | |
|---------------------|----------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| Water (T1) | 2,03 | B a | 1,86 | AB a | 1,00 | B b | 1,57 | A ab |
| Chlorine (T2) | 2,33 | A a | 2,04 | A ab | 1,99 | A ab | 1,58 | A b |
| SM® (T3) | 2,29 | A a | 2,46 | A a | 2,06 | A ab | 1,62 | A b |
| SG® (T4) | 2,74 | A a | 2,27 | A ab | 1,70 | A b | 1,61 | A b |
| SM® not rinsed (T5) | 1,53 | B a | 1,50 | B a | 2,00 | A a | 1,47 | A a |
| SG® not rinsed (T6) | 1,80 | B a | 2,13 | AB a | 2,03 | A a | 1,67 | A a |

Different letters in column (A,B,C) and in rows (a,b,c) indicate significant differences among treatments according to Tukey's test with a P value of 0.05.

Firmness (g)

| Type | Treatments | Day | | |
|-------|---------------------|---------------|---------------|---------------|
| | | 0 | 5 | 7 |
| | | Mean ± SE | Mean ± SE | Mean ± SE |
| Leaf | Water (T1) | 21.66 ± 6.61 | 13.98 ± 0.59 | 13.36 ± 3.28 |
| | Chlorine (T2) | 64.06 ± 17.55 | 48.07 ± 10.72 | 55.62 ± 25.26 |
| | SM® (T3) | 50.98 ± 10.40 | 41.79 ± 10.74 | 39.15 ± 16.41 |
| | SG® (T4) | 46.02 ± 11.99 | 62.24 ± 11.54 | 67.60 ± 39.10 |
| | SM® not rinsed (T5) | 14.65 ± 5.44 | 14.14 ± 1.58 | 16.98 ± 10.10 |
| | SG® not rinsed (T6) | 13.13 ± 1.73 | 19.81 ± 6.23 | 44.99 ± 16.82 |
| Steam | Water (T1) | 462.7 ± 17.0 | 460.9 ± 88.5 | 405.8 ± 82.7 |
| | Chlorine (T2) | 502.6 ± 74.7 | 509.0 ± 63.0 | 372.9 ± 53.8 |
| | SM® (T3) | 374.1 ± 79.1 | 395.7 ± 57.0 | 420.2 ± 41.0 |
| | SG® (T4) | 474.1 ± 117 | 495.4 ± 98.1 | 397.3 ± 83.9 |
| | SM® not rinsed (T5) | 487.0 ± 86.7 | 371.0 ± 88.6 | 322.5 ± 68.6 |
| | SG® not rinsed (T6) | 302.5 ± 95.3 | 440.3 ± 49.0 | 404.9 ± 59.1 |

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de sanitizantes reduz a contagem microbiológica inicial presente em hortícolas, bem como a contagem de bactérias patogênicas, mas a inativação completa de patógenos não é possível, assim, a implementação de Boas Práticas Agrícolas e Boas Práticas de Fabricação são programas necessários na cadeia produtiva de hortícolas minimamente processadas, pois objetivam reduzir e manter contagens microbiológicas de espécies hortícolas em níveis aceitáveis.

A cadeia produtiva de minimamente processados no Rio Grande do Sul não possui legislação específica, o que dificulta a implementação adequada da etapa de sanitização nas indústrias de hortícolas minimamente processadas, assim, esse setor produtivo torna-se um potencial risco de DTAs.

A eficácia de um sanitizante deve ser medida em condições próximas às encontradas no processo industrial, visando determinar a real atuação do sanitizante diante de condições extremas de processo. Assim, a medição de parâmetros como pH, temperatura, concentração e tempo de contato é necessária, e além disso, a medição da carga orgânica durante processamento é importante, visto que a atuação dos sanitizantes é afetada por concentrações elevadas de matéria orgânica. O presente trabalho não mensurou a eficácia dos extratos de taninos em altas concentrações de matéria orgânica, sendo um ponto importante a ser estudado.

Taninos podem se complexar com proteínas e minerais, assim, é necessária uma avaliação de perdas/redução de minerais por consumo contínuo, bem como, estudos toxicológicos sobre a ingestão contínua dos extratos de taninos avaliados no presente estudo.

A análise da qualidade visual das amostras de alface não foi mensurada, e não foi realizado um teste de aceitação do consumidor através de painel sensorial.

Esses parâmetros são importantes para aceitação global dos extratos de taninos como sanitizantes de alfaces.

As amostras de alface minimamente processada apresentaram medições de textura do talo e folha com grande variação, o que dificultou a análise dos resultados. Acredita-se que o método utilizado para medição de textura das folhas de alface não foi o mais adequado, possivelmente devido a grande variabilidade nas amostras, já que as folhas de alface apresentam vascularizações diferentes, o que gera maior ou menor resistência. Portanto, acredita-se que um teste sensorial com equipe treinada para avaliação da qualidade das amostras de alface, seria uma alternativa viável.

Os extratos de taninos apresentaram efeito limitado ao longo do armazenamento de alface minimamente processada, porém podem ser alternativas viáveis na desinfecção da água de lavagem das alfaces, reduzindo a microbiota inicial e assim, impedir a contaminação cruzada durante o processamento mínimo. Outra alternativa é a utilização de extratos de taninos em tanques de armazenamento de água utilizada por agricultores para enxague de alface antes da comercialização, o que possibilitaria uma água de lavagem com controle da contagem microbiana e evitaria contaminação cruzada.

5 CONCLUSÕES

Em relação à inoculação de células de *Escherichia coli* na superfície de alface, os extratos tânicos SM® 1% e SG® 1% reduziram significativamente o número de células, comparando-se a eficácia de redução do hipoclorito de sódio, enquanto o extrato tânico AQ® apresentou a menor redução, não diferindo estatisticamente da redução obtida pelo uso de água.

Após incubação de 24h observou-se formação de agregados celulares e foi possível visualizar células de *E. coli* no interior dos estômatos da folha de alface. Além disso, os tratamentos SM® e SG® foram menos eficazes na redução de células de *E. coli* após incubação por 24 h comparada à incubação de 2h, o que sugere que a internalização de bactérias no interior dos tecidos vegetais limitou a ação dos extratos de taninos.

Considerando as análises microbiológicas realizadas na alface americana minimamente processada sob atmosfera modificada, os extratos de taninos SM® 1% e SG® 1%, ambos aplicados por 10 min e com posterior enxague, promoveram redução na contagem da população microbiana similar ao uso de hipoclorito de sódio.

Os extratos de taninos SM® 1% e SG® 1% aplicados por 10 minutos, sem posterior enxague, apresentaram contagens microbiológicas similares aos demais tratamentos ao longo do armazenamento da alface, porém a qualidade visual das amostras após sete dias de armazenamento estava inaceitável.

Os extratos de taninos reduziram significativamente a contagem microbiológica inicial das amostras de alface, porém ao longo do armazenamento, a população microbiana aumentou para todos os tratamentos testados, e aos nove

dias de armazenamento, os extratos de taninos se igualaram aos demais tratamentos.

Na avaliação dos parâmetros físico-químicos, os valores de acidez titulável para todos os tratamentos não diferiram aos 9 dias de armazenamento, possivelmente indicando o final da vida de prateleira da alface minimamente processada, nas condições do experimento. E em relação à cor, os tratamentos a base de cloro, SM® e SG® apresentaram os melhores resultados ao longo do armazenamento.

