



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MICROBIOTA DE ALFACE (*Lactuca sativa*
VAR. *crispa*) MINIMAMENTE PROCESSADA:
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
RESISTENTES AOS SANITIZANTES CLORADOS
UTILIZANDO O SEQUENCIAMENTO DE NOVA
GERAÇÃO - SNG

ELISA SONZA

PINHALZINHO, 2018

ELISA SONZA

**MICROBIOTA DE ALFACE (*Lactuca sativa* VAR. *crispa*) MINIMAMENTE
PROCESSADA: CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
RESISTENTES AOS SANITIZANTES CLORADOS UTILIZANDO O
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO – SNG**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Propriedade e Segurança dos Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Liziane Schittler

**Pinhalzinho, SC
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Sonza, Elisa
MICROBIOTA DE ALFACE(Lactuca sativa VAR. crisper)
MINIMAMENTE PROCESSADA: CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS RESISTENTES AOS SANITIZANTES CLORADOS UTILIZANDO O
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - SGN / Elisa Sonza. -- 2018.
75 p.

Orientador: Liziane Schittler
Coorientador:
Dissertação (Mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação , Chapecó, 2018.

1. vegetais. 2. micro-organismos. 3. contaminação. 4.
sequenciamento da nova geração. I. Schittler, Liziane . II.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação
Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação . III. Título.

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**MICROBIOTA DE ALFACE (*Lactuca sativa* VAR. *crispa*) MINIMAMENTE
PROCESSADA: CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
RESISTENTES AOS SANITIZANTES CLORADOS UTILIZANDO O
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO – SNG**

Elaborada por
ELISA SONZA

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Liziane Schittler – Orientadora (UDESC Oeste – Pinhalzinho/SC)



Prof. Dra. Anieli Pinto Kempka (UDESC Oeste – Pinhalzinho/ SC)



Prof. Dra. Ângela Maria Fiorentini (UFPel – Pelotas/RS)

Pinhalzinho, 26 de novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva da vida, por ter me abençoado nas viagens e nos momentos de angústia e cansaço.

A todos meus familiares, pai e mãe, e em especial ao meu filho Bernardo e ao meu marido Evandro, por estarem ao meu lado me apoiando e incentivando, para que eu pudesse dedicar meu tempo aos estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, a todos os professores, em especial a minha orientadora Dra. Liziane Schittler, pela dedicação, paciência e por compartilhar muito conhecimento durante este período. Também agradeço, pelo profissionalismo com que a profa “Lizi” conduziu toda orientação e pela confiança em mim.

Ao SENAI de Chapecó, que oportunizou que este sonho pudesse ser realizado, através da dispensa e incentivo bem como na utilização do laboratório didático, para que parte dos experimentos pudessem ser realizados.

A agroindústria familiar Scussel Verduras, administrada pelo Jucimar Scussel e sua equipe, que gentilmente me acolheu durante todo o projeto, proporcionando discussões e muito aprendizado bem como na doação da alface para realização dos experimentos.

As minhas amigas e colegas Josiane Kilian, Sinara Bordignon, Fabiane Schuster, Cristiane Borscheid, Elis Favero e Joceane Pigatto, pela inspiração, parceria e conhecimento compartilhado.

Ao meu colega de mestrado Ivan De Marco pelo auxílio na realização dos experimentos, como também aos outros colegas do Microlab que apoiaram no desenvolvimento deste projeto.

Enfim, minha eterna gratidão, a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram durante este processo de aprendizagem, e que mesmo não mencionadas aqui serão eternamente lembradas.

RESUMO

A alface é um alimento geralmente consumido *in natura*, cuja a sanitização inadequada, pode ser meio de transmissão de várias doenças. Assim, a higienização, que consiste nas etapas de lavagem e desinfecção, através da aplicação de um agente sanitizante, torna-se fundamental para garantir o alimento seguro. Este estudo teve como objetivo caracterizar e identificar a microbiota de alface (*Lactuca sativa* var. *crispa*) minimamente processada resistentes aos sanitizantes clorados utilizando o SNG. Para isto, alfaces foram submetidas aos sanitizantes clorados, dióxido de cloro 80 ppm, a mistura de dicloroisocianurato de sódio e cloreto de sódio 148 ppm e hipoclorito de sódio 200ppm durante 0,5, 1,0 e 5,0min. Foram realizadas contagens dos grupos de micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e bactérias ácido lácticas (BAL). O hipoclorito de sódio (NaClO) 200ppm apresentou melhor eficiência na redução dos micro-organismos mesófilos e enterobactérias. Desta forma, para avaliar o comportamento da microbiota durante a vida útil, realizou-se as contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e bactérias ácido lácticas em alfaces sanitizadas com 200ppm (NaClO) e armazenadas a 2 e 8°C, por 15 e 6 dias, respectivamente. Utilizou-se o SNG para identificar a microbiota da alface *in natura* (suja), alface sanitizada com 200ppm (NaClO), como também nas alfaces sanitizadas 200ppm (NaClO) e armazenadas a 2 e 8°C, por 15 e 6 dias respectivamente. A alface sanitizada durante a vida útil mantém a maioria da microbiota *in natura*, inclusive os patógenos. No entanto, as espécies prevalentes na estrutura folicular após a sanitização foram o *Lactococcus lactis* e *Enterobacter cloacae*, e durante a vida útil, predominaram as espécies *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fulva* e *Pseudomonas monteiili*. Este estudo demonstrou que, os cuidados no cultivo, manipulação, transporte e armazenamento sob refrigeração adequada são fundamentais para garantir a segurança deste vegetal.

Palavras-chave: Vegetais. Micro-organismo. Contaminação. Sequenciamento de Nova Geração.

ABSTRACT

Lettuce is a food usually consumed in natura, whose inadequate sanitation, can be means of transmission of several diseases. Thus, sanitizing, which consists in the steps of washing and disinfecting, through the application of a sanitizing agent, become essential to ensure safe food. The objective of this study was to characterize and identify the microbiota of lettuce (*Lactuca sativa* var. *Crispa*) minimally processed resistant to chlorinated sanitizers using SNG. For this, lettuces were subjected to chlorinated sanitizers, chlorine dioxide 80 ppm, the mixture of sodium dichloroisocyanurate and sodium chloride 148 ppm and sodium hypochlorite 200ppm for 0.5, 1.0 and 5.0min. The groups of mesophilic aerobic, psychrotrophic, enterobacteria and lactic acid bacteria (BAL) groups were counted. Sodium hypochlorite (NaClO) 200ppm showed better efficiency in the reduction of mesophilic microorganisms and enterobacteria. In order to evaluate the behavior of the microbiota during the shelf life, counts of mesophilic microorganisms, psychrotrophic, enterobacteria and lactic acid bacteria were carried out in 200ppm (NaClO) sanitized lettuces and stored at 2 and 8 ° C, for 15 and 6 days, respectively. The SNG was used to identify the microbiota of fresh lettuce (dirty), lettuce sanitized with 200ppm (NaClO), as well as 200ppm (NaClO) sanitized lettuce and stored at 2 and 8 ° C for 15 and 6 days, respectively. Sanitized lettuce during shelf life keeps most of the microbiota in natura, including pathogens. However, the species prevalent in the follicular structure after sanitization were *Lactococcus lactis* and *Enterobacter cloacae*, and during the life span, the species *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fulva* and *Pseudomonas monteilli* predominated. This study demonstrated that careful cultivation, handling, transport and storage under adequate refrigeration are fundamental to guarantee the safety of this plant.

Key-words: Vegetables. Microorganism. Contamination. Next Generation Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Colonização foliar de micro-organismos.....	25
Figura 2 - Sequenciamento pelo método de Sanger	33
Figura 3 - Esquema do princípio da técnica Illumina.	37
Figura 4 - Identificação do Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e espécie (%) na microbiota da alface in natura () e na alface sanitizada com hipoclorito de sódio (200 ppm) por 0,5 min. ().....	51
Figura 5 - Identificação dos Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros e espécies (%) na microbiota da alface sanitizada com hipoclorito de sódio (200 ppm), armazenada a 2°C por 15 dias () e da alface sanitizada com hipoclorito de sódio (200 ppm), armazenada a 8°C por 6 dias ().	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos.	39
Tabela 2 - Média das contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface <i>Lactuca sativa</i> L. variedade <i>crispa in natura</i> e submetida aos tratamentos com sanitizantes clorados, dióxido de cloro(ClO ₂), dicloroisocianurato de sódio (C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃) e hipoclorito de sódio (NaClO) nos tempos 0,5, 1,0 e 5,0 minutos	44
Tabela 3 - Contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, enterobactérias e BAL (log UFC-1) em alface armazenada à 2°C e 8°C por 15 e 6 dias, respectivamente.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC - *Association of Official Agricultural Chemists*
APHA - *American Public Health Association*
BAL - Bactérias Ácido Láticas
BHI - Brain Heart Infusion Broth
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
ClO₂ - dióxido de cloro
DTA - Doença Transmitida por Alimentos
DNA - ácido desoxirribonucleico
EB - Enterobactérias (petrifilm)
EUA - Estados Unidos da América
GRAS - *Generally Recognized As Safe*
ISO - *International Organization for Standardization*
ICMSF - *International Commission On Microbiological Specifications For Foods*
LOG - Logarítimo
MRS - Man Rogosa e Sharpe
NaClO - hipoclorito de sódio
NH - grupo amino
NGS - *Next Generation Sequencing*
OTU - Unidade Taxonômica Operacional
PCA - Plate Count Ágar
PCR - Reação de cadeia de Polimerase
PEBD - Polietileno de baixa densidade
pH - potencial hidrogeniônico
ppm - parte por milhão
RNA - ácido ribonucleico
RT - Terminadores reversíveis

RTE - *Ready-to-eat*

SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

SGN - Sequenciamento de Nova Geração

STEC - *Escherichia coli* shigatoxigênica

SVS - Sistema de Vigilância da Saúde

THM - trihalometano

UDESC - Universidade do Estado de Santa Catarina

UV - ultravioleta

VMP - Vegetais Minimamente Processados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.2 OBJETIVOS.....	19
1.1.1 Objetivo geral.....	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 ALFACE <i>Lactuca sativa</i> L.....	21
2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E INTERNACIONAL.....	23
2.3 COLONIZAÇÃO E MICROBIOTA.....	24
2.4 PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO	27
2.5 SANITIZANTES CLORADOS	28
2.5.1 Dióxido de Cloro.....	29
2.5.2 Dicloroisocianurato de sódio.....	30
2.5.3 Hipoclorito de sódio.....	31
2.6 SEQUENCIAMENTO DE DNA POR MÉTODO DE SANGER.....	32
2.7 SEQUENCIAMENTO DA NOVA GERAÇÃO (SNG) – NGS (NEXT GENERATION SEQUENCING)	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 PREPARO DA AMOSTRA.....	38
3.2 CONTAGEM MICROBIANA	39
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
3.4 CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, ENTEROBACTÉRIAS E BAL EM ALFACE APÓS A SANITIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO	40
3.5 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DA ALFACE RESISTENTE AO PROCESSO DE SANITIZAÇÃO BEM COMO DURANTE O ARMAZENAMENTO ATRAVÉS DO SNG.....	41
3.6 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL PELO SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	41

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
4.1 CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, ENTEROBACTÉRIAS E BAL EM ALFACE.....	43
4.2 EFEITO DO SANITIZANTE, TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A MICROBIOTA DE MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, ENTEROBACTÉRIAS E BAL.....	48
4.3 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DA ALFACE ATRAVÉS DO SGN.....	50
4.4 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DA ALFACE SANITIZADA E ARMAZENADA A 2 E 8°C.....	53
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL PELO SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	56
5. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

O consumo de vegetais vem aumentando gradualmente em todo o mundo, devido à preocupação da população por hábitos mais saudáveis. Dentre os vegetais, a alface (*Lactuca sativa* L.) variedade *crispa*, tem sido reconhecida como a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil (FERNANDES et al., 2002; SANTANA et al., 2006; ABCSEM, 2017).

Tradicionalmente, os produtos frescos como a alface eram lavados e rapidamente consumidos no próprio local de preparo, no entanto com a a globalização da economia incentivou o consumo de vegetais minimamente processados, o qual proporciona praticidade e conveniência aos consumidores.

Com isto, houve a preocupação quanto ao risco de contaminação microbiana (MARIANO et al., 2005), haja visto que, estes produtos a maioria das vezes não passam por tratamentos térmicos antes do consumo. Para garantir ao consumidor a segurança dos vegetais minimamente processados é necessário que o processo de higienização seja eficiente.

A vida útil dos alimentos é o período decorrido entre sua produção e aquele em que o produto, mantêm as suas características de qualidade próprias para consumo. Este tempo varia dependendo do tipo de alimento, temperatura de estocagem e embalagem utilizada (MELLO et al., 2003). Dentre os principais interferentes na vida útil está a contaminação microbiana. A microbiota natural dos vegetais provém do ambiente, sendo influenciado pela técnica de cultivo, estrutura da planta, transporte e armazenamento. A alface é cultivada através dos métodos convencional, hidropônico ou orgânico, sendo o método convencional o mais utilizado (GOMES NETO et al., 2012). No sistema convencional, e o que avaliamos neste estudo, o vegetal fica exposto a diferentes fontes de contaminações microbianas com o a água de irrigação, o solo e o adubo utilizado no cultivo (SILVEIRA et al., 2017).

Os vegetais, assim como a alface apresentam em sua anatomia folicular os estômatos, que são estruturas celulares que têm a função de realizar trocas gasosas entre a planta e o meio ambiente, que por consequência protegem e favorecem a permanência de micro-organismos no interior das folhas (LÓPEZ-GÁLVEZ et al., 2010).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC (2018), o abrigo de patógenos nos estômatos, pode estar relacionada a surtos de doenças transmitidas por alimentos causando desde gastroenterites até a complicações mais severas, podendo levar a morte.

A inocuidade dos vegetais é garantida utilizado o processo de higienização, que consiste nas etapas de limpeza e sanitização, o qual tem como objetivo reduzir ou eliminar a microbiota até níveis aceitáveis (MORETTI, 2007). O cloro, nas suas várias formas, consiste no sanitizante mais utilizado em alimentos. Dentre eles, destaca-se o uso de dióxido de cloro, dicloroisocianurato de sódio e o hipoclorito de sódio nas concentrações de 50 - 200 ppm (ANTONIOLLI et al., 2005).

Os compostos à base de cloro, apresentam ação germicida de amplo espectro, reagem com as proteínas da membrana das células microbianas, interferindo no transporte de nutrientes e promovendo a perda de componentes celulares, comprometendo a sobrevivência do micro-organismo (BANACH et al., 2015). O uso de sanitizantes clorados se deve ao seu baixo custo, boa eficácia na eliminação de micro-organismos, impacto reduzido sobre a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos bem como apresenta ótima solubilidade em água e disponibilidade no mercado (GIL et al., 2015; BANACH et al., 2015). O conhecimento da microbiota do alimento e sua interação com o sanitizante é de fundamental importância para garantir a segurança e a vida útil do produto.

Para a identificação da microbiota podem ser utilizados os métodos moleculares como o sequenciamento genético de Sanger, ou a nova tecnologia conhecida como Sequenciamento de Nova Geração - SNG. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (CARVALHO; SILVA, 2010).

Neste estudo utilizou-se o SNG, o qual permite obter informação da genética de micro-organismos presentes na amostra a nível comunitário. Essas novas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base sequenciada. Essa maior eficiência advém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo

trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis (CARVALHO; SILVA, 2010). Esta técnica é considerada a revolução da microbiologia, pois auxilia a investigação de microbiota de vários habitats do solo, e alimentos, pela tecnologia de alto rendimento (MAYO et al., 2014; SOLIERI et al., 2013).

1.2 OBJETIVOS

A seguir são apresentados os objetivos que norteiam a pesquisa.

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar e identificar a microbiota de alface (*Lactuca sativa* var. *crispa*) minimamente processada resistentes aos sanitizantes clorados utilizando o SNG.

1.1.2 Objetivos específicos

- Quantificar os micro-organismos aeróbios mesófilos, psicotróficos, *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido lácticas (BAL) em alfaces *in natura*, alface lavada com água potável e alface lavada e sanitizada com compostos clorados;
- Utilizar análise estatística para determinar o sanitizante clorado (dióxido de cloro 80 ppm, dicloroisocianurato de sódio com cloreto de sódio 148 ppm e hipoclorito de sódio 200 ppm) e tempo de contato (0,5, 1,0 e 5,0 minutos) que apresentou melhor eficiência sobre a microbiota;
- Identificar a microbiota nativa e a microbiota resistente ao sanitizante com melhor eficiência em alface *Lactuca sativa* L. variedade *crispa*, através do SNG;
- Comparar o sequenciamento de Sanger de isolados de alface *Lactuca sativa* L. variedade *crispa* e o SNG;
- Avaliar a vida de útil da alface submetida ao sanitizante com melhor eficiência, mantidas a 2 e 8°C, durante 15 e 6 dias, respectivamente, através da contagem de micro-organismos mesófilos, psicotróficos, *Enterobacteriaceae* e BAL;

- Identificar a microbiota da alface submetida ao sanitizante com melhor eficiência e armazenadas a 2 e 8°C, por 15 e 6 dias, respectivamente, através do SNG.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo será apresentado o levantamento bibliográfico abordando os aspectos que envolvem a matéria-prima, sanitizantes, micro-organismos associados e estratégias de colonização.

2.1 ALFACE *LACTUCA SATIVA* L

A alface (*Lactuca sativa* L.), variedade *crispa* pertence à família *Asteraceae* (ITIS, 2018), e vem se constituindo como uma cultura relevante para a agricultura. Destaca-se como a folhosa mais consumidas no Brasil, por apresentar alto teor de vitaminas, sais minerais e fibras bem como baixo valor calórico (FERNANDES et al., 2002; SANTOS et al., 2012).

A produção brasileira anual é de aproximadamente de 1,7 milhão de toneladas de alface, sendo a variedade de maior plantio e consumo (ABCSEM, 2017). O cultivo da alface pode ser realizado através das técnicas: tradicional, hidroponia e orgânica.

O cultivo tradicional é caracterizado pela prática da utilização de fertilizantes químicos, e algumas vezes por sistema mecanizado (SANTANA, et al., 2006). O vegetal tem contato diretamente com o solo, o que contribui na diversidade da microbiota neste produto. Há exposição a diferentes bactérias, protozoários, fungos e vírus presentes no solo, representa risco a saúde do consumidor.

O cultivo hidropônico caracteriza-se pelo plantio em sistemas de canalização (tubos plásticos), onde recebem nutrientes ou fertilizantes previamente dissolvidos em água, ou seja, não ocorre o cultivo em ambiente natural (terra) (SANTANA, et al., 2006).

O cultivo orgânico busca a maximização dos recursos naturais e da preservação do meio ambiente, pois é um sistema de produção, que exclui o uso de fertilizantes químicos, ou outros promotores de crescimento de uso sintético. Este sistema de produção se beneficia de biocontroles, também conhecidos como controles biológicos que utilizam sistemas naturais como insetos, bactérias, fungos e até mesmo extratos vegetais como controle de pragas agrícolas (CHAGAS, et al., 2016).

A microbiota da alface esta diretamente relacionada com a técnica de plantio, solo, água e fertilizantes utilizados no cultivo bem como, com a contaminação cruzada após colheita e o armazenamento.

A anatomia da alface é muito peculiar, pois dispõem naturalmente de cutículas que contém ceras que reduzem a perda de umidade. Apresentam também os estômatos, que são pequenas aberturas que permite as trocas gasosas, captação de CO₂ atmosférico e liberação de O₂ para o ambiente. Além de que, quando abertos, permitem o abrigo de células bacterianas (BEATTIE; LINDOW, 1999) no seu interior, protegendo e favorecendo a permanência de micro-organismos após o processo de higienização (LÓPEZ-GÁLVEZ et al., 2010).

A higienização consiste nas etapas de remoção das sujidades, através da lavagem com água e posterior sanitização, com emprego de agentes antimicrobianos, que promovem a redução de micro-organismos até nível de segurança (KUAYE, 2017). A eficiência da sanitização confere um requisito importante em vegetais, como alface, por este alimento não passar na maioria das vezes pelo processo térmico de cocção e ir direto para a mesa do consumidor (NASCIMENTO et al., 2014).

Com a globalização da economia, e a mudança de hábitos alimentares da população mundial, fez com que os alimentos fossem comercializados de forma a oferecer facilidade e praticidade para o dia-a-dia. Os vegetais minimamente processados (*ready-to-eat* (RTE)), conhecidos como prontos para o consumo, conquistam mercado e consumidores (NASCIMENTO et al., 2014). Durante o processo de produção, os passam pela limpeza, corte ou retirada do centro que une as folhosas, sanitização, centrifugação para retirada da água, e o armazenamento em embalagem adequada para garantir uma vida útil de aproximada de 5 a 7 dias.

De acordo com *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) a *Escherichia coli* O157:H7 foi responsável por vários surtos no Canadá e EUA, sendo o alimento envolvido a alface. Em dezembro de 2017, na Califórnia ocorreu um surto envolvendo a *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) em alface, causando a hospitalização de nove indivíduos, dos quais, dois desenvolveram a síndrome hemolítica urêmica, levando uma pessoa a óbito (CDC, 2018). Os Órgãos de saúde de vários países, têm intensificado os trabalhos de fiscalização, para garantir a segurança microbiológica dos vegetais

minimamente processados (NASCIMENTO et al., 2014; VELDERRAIN-RODRIGUES et al., 2015).

No Brasil, de acordo com o Sistema de Vigilância da Saúde (SVS), os registros realizados até 2017, não especificam os vegetais em alimentos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos (DTAs). No entanto, podem estar sub representados no grupo de alimentos mistos ou outros alimentos, com 8,6 e 6,3%, envolvidos em DTA, respectivamente (BRASIL, 2017).

2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E INTERNACIONAL

No Brasil, os VMP ou RTE não dispõem de legislação específica, porém estes produtos devem atender os parâmetros microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na categoria de alimentos “frescas *in natura*, preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas para consumo direto”, o qual estabelece, ausência de *Salmonella* spp e o máximo de 10^2 UFC/g de coliformes termotolerantes (coliformes a 45°C).

Para a padronização dos processos industriais, garantia das condições higiênico sanitárias e Boas Práticas de Fabricação (BPF), o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 326 de 30 de julho de 1997, que estabelece diretrizes para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos.

Na Resolução RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002, dispõe de regulamento técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados e Lista de Verificação de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos.

O estado do Rio Grande do Sul, estabeleceu através da Portaria SES-RS Nº 90/2017, regulamento dos Procedimentos Operacionais Padronizados e as Boas Práticas de Fabricação para vegetais e frutas minimamente processadas. A portaria apresenta a lista de verificação de Boas Práticas de Fabricação para os segmentos produtores/industrializadores de vegetais, com o propósito de fiscalização sanitária estadual e municipal no cumprimento da norma (BRASIL, 2017). Nesta lista de avaliação

dos estabelecimentos, item 5 – Processamento de Frutas e Vegetais Frescos (5.10), estabelece o uso de substâncias cloradas nas concentrações entre 10 a 50 mg/L de cloro livre, desde que o tempo de contato com as frutas e vegetais, possa reduzir a carga microbiana a níveis seguros (BRASIL, 2017).

Internacionalmente os VMP são regulados por organizações que padronizam o controle sanitário dos alimentos e as BPFs. Estas organizações são o *Codex Alimentarius*, *Food and Drug Administration (FDA)*, *World Health Organization (WHO)*, *International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)* e *European Food Safety Authority (ESFA)*. Devido aos constantes surtos de patógenos ocorridos com vegetais, a organização norte americana (FDA), publicou em 2008 um guia para minimizar os perigos da segurança de alimentos de frutas e legumes frescos. A agência mantém orientações sobre as soluções sanitizantes para controlar os micro-organismos em alimentos através do Código de Regulamento Federal 21 CFR part 178 (FDA, 2018).

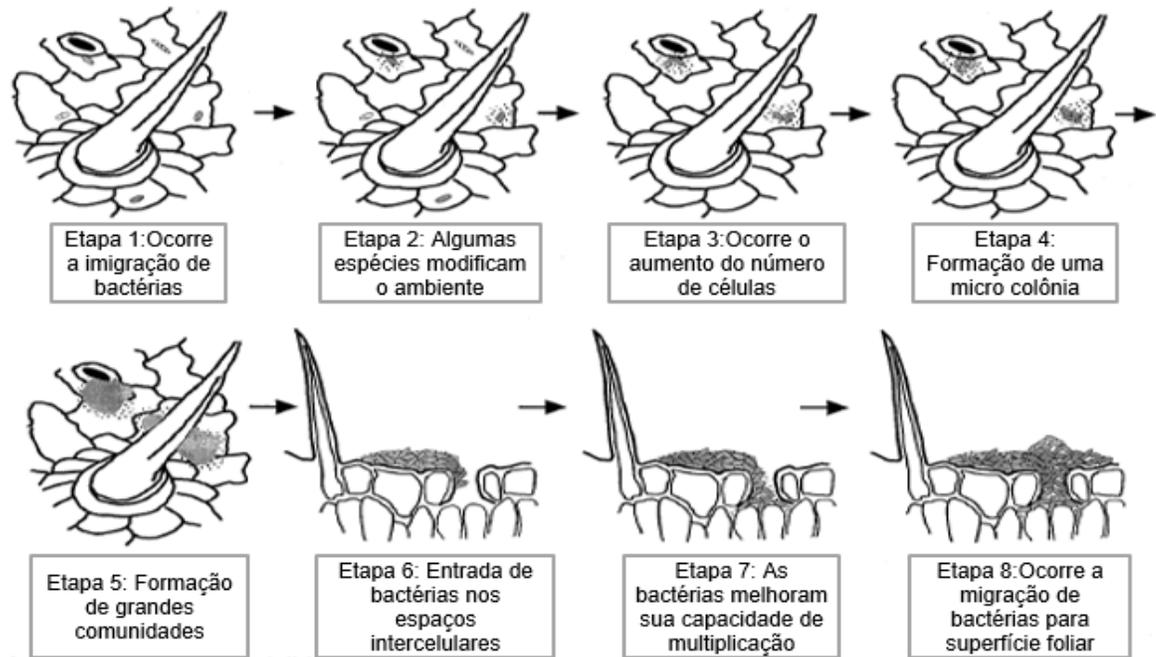
A Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (CFIA), recomenda através de guia de práticas para frutas e legumes prontos para consumo de minimamente processados, que o ideal é não exceder a 5 minutos de exposição de vegetais em contato com solução clorada, com posterior enxágue com água potável. Os métodos de verificação de segurança do produto, devem incluir amostragem e análise do produto em processo e produto acabado, identificando patógenos como *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, entre outros (CFIA, 2018).

2.3 COLONIZAÇÃO E MICROBIOTA

As bactérias desenvolvem Estratégias diferentes para a colonização em vegetais. Embora, exista semelhança nas necessidades entre as espécies bacterianas, a sobrevivência e o crescimento devem suportar a comunidade bacteriana associada a filosfera, ou seja, parte superficial das plantas, principalmente as folhas, como também os endófitos, denominação utilizado para caracterizar a colonização de micro-organismos no interior das folhas (JACKSON et al. 2013).

Para Beattie e Lindow (1999) existe um modelo que representa a colonização foliar que está representado pela figura 1.

Figura 1 - Colonização foliar de micro-organismos



Fonte: Adaptado de Beattie e Lindow (1999)

Inicialmente na etapa 1, a superfície foliar recebe aleatoriamente as células bacterianas ou aglomerados celulares via água, ar ou mesmo por vetores. Posterior a esta etapa, muitas destas células acabam se alojando nos estômatos da folha. Algumas espécies através de mecanismos modificam seu ambiente local, com a produção de polissacarídeos extracelulares. Na etapa 3, as espécies bacterianas que modificam seu ambiente, aumentam também o número de células. As que não apresentam esta característica, reduzem as chances de sobrevivência. Com a multiplicação celular, na etapa 4, há a formação de uma microcolônia, importante para o desenvolvimento comunitário, que pode ser homogênea (incorporação de mesma espécie) ou heterogênea (incorporação de espécies diferentes). Na etapa seguinte, ocorre o desenvolvimento de grandes comunidades oriundas das micro colônias formadas, e posterior a esta etapa, devido a alta densidade bacteriana, ocorre a indução da entrada de bactérias nos espaços internos das folhas. Na etapa 7, as bactérias modificam seu espaço intercelular e melhora a capacidade de multiplicação e termina o ciclo com uma migração para a superfície foliar, que pode ocorrer por lesão ou fitopatologia.

Muitos micro-organismos presentes na superfície foliar da alface, tem capacidade de produzir biossurfactantes. Os biossurfactantes são conhecidos como “agente ativo de superfície” (MARCHANT; BANAT, 2012), que contribuem para formação de biofilmes e aderência de patógenos em superfícies.

No estudo de ROSSI, et al. (2016), identificaram a produção de biossurfactante pela *Salmonella* Enteritidis SE86, o qual conferiu maior estabilidade e resistência frente a concentração de sais, pH e temperatura para este patógeno. Os testes *in vitro* realizados pelos autores, identificaram que o biossurfactante foi responsável pelo aumento da sobrevivência de *S. Enteritidis* SE86 quando exposto ao hipoclorito de sódio 50 ppm por 30 minutos e sem o biossurfactante a exposição do patógeno foi inativada em 15 minutos na mesma concentração. Estudos de Saravanakumari e Mani (2010), identificaram também a produção de biossurfactante pela bactéria láctica, *Lactococcus lactis*.

Na colonização microbiana das alfaces, há o predomínio de micro-organismos mesófilos, os quais, destacam-se os patogênicos, sendo estes os principais gêneros envolvidos em contaminações de vegetais minimamente processadas: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Clostridium* spp, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 H:7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp, *Vibrio* spp e *Campylobacter* spp. Além de dos vírus da Hepatite A e o Norovírus. Os parasitas a *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, entre outros (VANDAMM et al., 2013; ABADIAS et al., 2008; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2013; POSSAMAI, 2014). Os principais sintomas causados pelo consumo de vegetais contaminação por patógenos Estes patógenos acometem indivíduos provocando Doenças Transmitidas por Alimentos – DTA, que provocam desde náuseas, vômitos, gastroenterites, até diarreias sanguinolentas, desnutrição severa e podendo levar a morte.

A microbiota deteriorante é composta principalmente por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* spp, *Xanthomonas* spp, *Flavobacterium* spp, *Enterobacter* spp e alguns fungos. Dentre os gêneros destaca-se a *Erwinia* que provoca a podridão mole, causada pela capacidade desta bactéria em produzir enzimas pectinolíticas (pectinametilesterase e poligalacturonase), que digerem a lamela média das células acometidas e desorganiza os tecidos vegetais (AMORIM et al., 2011). Destaca-se os fungos do gênero *Botrytis* que

provoca a podridão pré ou pós colheita em aproximadamente 26 espécies de vegetais. Além dos gêneros *Colletotrichum spp.*, *Gloesporium spp.* entre outros.

A microbiota de vegetais minimamente processados é conhecida por conter as bactérias ácido lácticas (BAL) (WATADA; NATHANEE; MINOTT, 1996). Zwieler et al., (2008), identificaram BAL principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, na ordem de 10^4 a 10^5 UFC.g⁻¹/g em alface, o que, podemos interferir que a microbiota destes vegetais acelerar a deterioração e interfere na vida de prateleira dos VMP.

Para o controle de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes em vegetais após a colheita, utiliza-se baixas temperaturas durante seu processamento e estocagem (SANT'ANA, et al., 2012; POSADA-IZQUIERDO et al., 2013; EFSA, 2014).

2.4 PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO

A higienização compreende nas etapas de lavagem e sanitização (GERMANO, 2008). A lavagem com água potável tem como objetivo, retirar sujidades grossas, bem como reduzir a matéria orgânica inicial (COSTA, et al., 2012). A sanitização consiste na aplicação de desinfetantes, a fim de reduzir a carga microbiana até níveis seguros (NASCIMENTO, et al., 2002). Ao final do processo, se faz necessário o enxágue para remover o residual dos produtos químicos (GERMANO, 2008; COSTA, et al., 2012).

A água utilizada no processo é considerada ponto crítico, sendo necessário o monitoramento do pH e a qualidade microbiológica da mesma para evitar a contaminação cruzada entre os lotes de vegetais. Também outros aspectos como, temperatura da água, tempo de contato e concentração dos sanitizantes utilizados em relação ao volume de vegetais no tanque são importantes para atender a eficiência desejada (NASCIMENTO, et al., 2014).

A definição de sanitizante relatada na RDC nº 14 de 28 de fevereiro de 2007, preconiza um agente e/ou produto que possa reduzir o número de bactérias a níveis seguros conforme as normas da saúde (BRASIL, 2007). Os sanitizantes podem reduzir entre 1 e 2 log sobre a população inicial de micro-organismos nos alimentos, visto que, conforme a característica destes alimentos, as concentrações podem iniciar com contagens entre 10^5 a 10^7 (OLIVER; GERMANO; VEIGA, 2012).

As indústrias utilizam frequentemente agentes clorados como sanitizante. Estes são utilizados devido ao seu baixo custo, ótima solubilidade, além de não interferirem na qualidade sensorial e nutricional dos vegetais. Também apresentam eficiência contra bactérias (forma vegetativa) e alguns vírus (GIL et al., 2015; BANACH et al., 2015).

Como desvantagem na utilização de compostos clorados na sanitização de vegetais podemos citar, em contato com altas cargas orgânicas, os agentes clorados formam trihalometanos, que são compostos carcinogênicos (ÖLMEZ; KRETZSCHAMR, 2009). Dentre os principais trihalometanos formados, estão o clorofórmio, o bromodiclorometano, o dibromoclorometano e o bromofórmio.

A higienização tem sua eficiência limitada pela resistência de alguns micro-organismos presente na matriz alimentar aos sanitizantes utilizados, comprometendo o nível de segurança destes vegetais (GIL, 2009).

Muitos estudos disponíveis na literatura relatam, que a lavagem com água e soluções cloradas, podem reduzir de 2 a 3 unidades logarítmicas a população microbiana na superfície dos VMP. Porém, como as avaliações são realizados em escala laboratorial, estes podem não representar os mesmos resultados, quando comparado com uma planta de processamento (BEUCHAT et al, 2004; GONZALEZ et al., 2004; INATSU et al., 2005; UKUKU et al., 2005; ALLENDE et al., 2007; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007; SELMA et al., 2008).

2.5 SANITIZANTES CLORADOS

Os sanitizantes clorados são classificados, conforme sua origem, como orgânicos e inorgânicos (EVANGELISTA, 2000). Entre os compostos orgânicos clorados, destacam-se o diclorocianúrico, as cloraminas e o ácido triclorocianúrico. Os compostos inorgânicos clorados podemos citar o hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, cloro gasoso e hipoclorito de cálcio.

2.5.1 Dióxido de Cloro

O Dióxido de cloro apresenta em sua formulação, um átomo de cloro e dois de oxigênio (ClO_2) (CZARNESKI, 2007; RASTOGI et al., 2012; PRATAS, 2014), pode ser encontrado na forma de líquido e gás (CZARNESKI, 2007; RASTOGI et al., 2012). Embora diluído, tem uma molécula altamente energética, que pode reagir fortemente com agentes redutores (PRATAS, 2014).

Este composto, apresenta boa estabilidade em $\text{pH} < 7$, temperatura $< 25\text{ }^\circ\text{C}$ e baixa incidência de luz. Caso contrário, pode acelerar sua decomposição no meio em que se encontra, reduzindo a sua ação (PRATAS, 2014).

O dióxido de cloro possui a vantagem, de não produzir as cloraminas bem como baixas concentrações de trihalometanos (THM). Como desvantagem, o dióxido de cloro em água forma o clorito (ClO_2) e o clorato (ClO_3), que podem reagir com a hemoglobina do sangue e afetar a coagulação, tornando frágil a saúde humana. Além da utilização na forma de gás é necessário alto investimento na aquisição de equipamento. (MASSAGUER, 2006).

O mecanismo de ação antimicrobiano do ClO_2 , se deve pela ação oxidante do composto, que causa a perda da permeabilidade da membrana celular dos micro-organismos (AIETA; BERG, 1986; ANDRADE, 2010)

No estudo de SINGH et al., (2002), onde inocularam *E. coli* O157:H7 em alface e submeteram a imersão por 5 min em 10 mg. L^{-1} de ClO_2 , houve a redução de $1,20\text{ log UFC.g}^{-1}$ nas contagens do micro-organismo. No estudo de Zhang e Farber (1996), inocularam *L. monocytogenes* em alface e repolho, e submeteram a imersão em 5 mg. L^{-1} de ClO_2 por 10 min, relatam a redução de $0,8\text{ log UFC.g}^{-1}$ nas contagens dos micro-organismos.

PAO et al., (2007), verificaram em seus experimentos, que o dióxido de cloro 20 mg. L^{-1} aplicado em tomate por 1 min, reduziu 5 log UFC.g^{-1} de *Salmonella* Enterica.

O dióxido de cloro também se mostrou eficaz na inativação de enterovírus, amebas, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* (FINCH; BELOSEVIC, 2002; ANDRADE, 2010).

2.5.2 Dicloroisocianurato de sódio

O dicloroisocianurato de sódio apresenta fórmula química $C_3CL_2N_3NaO_3$, e sua ação inicial é baixar o pH da água, diferente de outros agentes clorados (TOLEDO, 2013). Quando comparados com os sanitizantes inorgânicos a base de cloro, apresenta uma eficácia mais duradoura, por ser mais estável em solução aquosa, devido a liberação de forma mais lenta do ácido hipocloroso. Não apresenta níveis importantes de trihalomentos, pois é menos reativo a matéria orgânica (ANDRADE, et al., 1996; SALOMÃO, et al., 2011).

Este biocida é muito utilizado na forma de pó ou grânulo, é solúvel em água, e sua melhor ação é na faixa de pH entre 6 e 10. Atua reduzindo o pH da água, desta forma, grande parte do cloro fica disponível, ou seja, livre para ação sobre o micro-organismos.

Ação do cloro, se deve a formação do ácido hipocloroso, que destroe o sistema enzimático dos micro-organismos (TOLEDO, 2013).

Estudo de Maffei e seus colaboradores (2016), mostrou que o composto orgânico dicloroisocianurato de sódio, na concentração acima de 10 mg/L foi capaz de eliminar o patógeno *Salmonella* Typhimurium em alface. Salomão, et al., (2011), avaliaram o dicloroisocianurato de sódio contra esporos de *Penicillium expansum* em maçã, e verificaram que a concentração de 50 ppm do composto submetido por dois minutos, e a concentração de 25 ppm por 3 minutos, foram significativamente iguais na redução de quatro log decimais. Estes autores também demonstraram que houve redução de 3,8 log decimais de esporos de *Penicillium expansum* quando submetido os esporos por um minuto em dicloroisocianurato de sódio na concentração de 25 ppm. O *Penicillium expansum* é responsável pela produção da micotoxina Patulina, sendo que o dicloroisocianurato de sódio é eficaz contra este micro-organismo, reduzindo o risco no produto final (SALOMÃO, et al., 2011).

2.5.3 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio (NaClO), é conhecido como “água sanitária”, comercializado na concentração entre 2,0 e 2,5% p/v de cloro. Quando adicionado a água reage e produz ácido hipocloroso ($\text{NaClO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HClO} + \text{NaOH}$) (LARGURA, 2007).

O hipoclorito de sódio é altamente ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, esporos bacterianos, vírus, fungos e micobactérias (LARGURA, 2007). A ação antimicrobiana do cloro se deve ao ácido hipocloroso, que reage com os sítios enzimáticos bacterianos, levando a inativação irreversível (referência). Há formação de cloraminas que ocorre, quando o cloro reage com grupo amino (NH), que também interfere no metabolismo celular (ESTRELA, et al., 2002). O hipoclorito de sódio apresenta um pH que pode variar de 11 a 12,5 (TOLEDO, 2013).

O hipoclorito de sódio apresenta uma série de vantagens entre elas, fácil manuseio e diluição, baixo custo, rápido efeito contra micro-organismos, inclusive endosporos (BOTH, et al., 2009). No entanto, alta temperatura e a luz, podem causar a volatilização do cloro, diminuindo a sua eficiência. De acordo com SILVA JR (2002), recomenda-se a concentração de 50 a 250 ppm para sanitização de vegetais.

No estudo realizado por LEE, et al., (2009), a alface submetida a concentração de 50 ppm de hipoclorito de sódio por 1 minuto, foi capaz de reduzir 0,63, 1,53 e 1,63 log UFC.g⁻¹, de micro-organismos mesófilos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Quando os mesmos autores, avaliaram as concentrações de 100, 250 e 300 ppm de hipoclorito de sódio em alface, não foram quantificados os micro-organismos mesófilos, *E. coli* e *S. aureus*.

Na sanitização de frutas, legumes e vegetais, o hipoclorito de sódio é amplamente empregado para redução da contaminação bacteriana, porém se faz necessária a pré-lavagem das matérias-primas antes do tratamento com cloro para apresentar eficácia (PARK, et al., 2013).

2.6 SEQUENCIAMENTO DE DNA POR MÉTODO DE SANGER

O sequenciamento é uma técnica que permite identificar, na ordem correta, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, visando conhecer a informação genética contida nesta estrutura (MOREIRA, 2015). O sequenciamento, seguido de uma correta montagem das sequências obtidas, permite obter informações referentes a: expressão gênica diferencial, estrutura e função dos genes, diversidade genética, presença de elementos móveis no genoma, presença de genes adquiridos por transferência lateral, relações evolutivas, além de permitir a construção de mapas metabólicos dentre outras (NIERMAN, et al., 2000).

O método de Sanger, também conhecido como método de “primeira geração de sequenciamento”, foi desenvolvido pelo britânico Frederick Sanger e seus colaboradores em 1977 (KAUR; MALIK, 2013). Este método foi responsável pelo sequenciamento completo do genoma da bactéria *Haemophilus influenzae* em 1995 (FLEISCHMANN et al., 1995).

fará a comparação entre os fragmentos obtidos e similaridade de genomas presente no banco de dados, permitindo a identificação de micro-organismos. Dentre os *software* utilizados, destaca-se o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que está disponível no endereço eletrônico: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (ALTSCHUL, 1990; NCBI, 2018).

2.7 SEQUENCIAMENTO DA NOVA GERAÇÃO (SNG) – NGS (NEXT GENERATION SEQUENCING)

Com a evolução em diversas áreas, principalmente a informática, a partir dos anos 2000, iniciou-se pesquisas com intuito de consolidar, o uso de técnicas de sequenciamento em larga escala do gene de RNA ribossômico 16S (rRNA), com marcador molecular para caracterizar os grupos bacterianos.

Novas técnicas conhecidas como Next Generation Sequencing (NGS), ou seja, sequenciamento da nova geração (SNG), revolucionaram a cobertura genômica, são responsáveis por leituras de DNA, com uma maior precisão e com redução de tempo de análise (METZKER, 2010; LOMAN et al., 2012).

A “Era da Metagenômica” como também é conhecida, proporcionou uma melhor obtenção de sequências de DNA, e a possibilidade de caracterizar qualquer comunidade bacteriana que esteja presente em uma amostra ambiental, como por exemplo água e alimento. Esta metodologia não tem necessidade de isolamento e cultivo pelos métodos da microbiologia tradicional, haja visto, que o objetivo é, fornecer informações consideráveis sobre o papel que estas comunidades desempenham no alimento (RAPPE; GIOVANNONI, 2003; TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008).

As plataformas utilizadas para o SNG estão disponíveis nas versões segunda e terceira gerações. Destaca-se as plataformas de segunda geração: Illumina GA IIx (Illumina), 454 GS FLX system (Roche), SOLiD 5500 XL system (ABI) e HeliScope (Helicos). As de terceira geração contam com as plataformas: Ion Personal Genome

Machine – Ion P M™ (Life Technologies), ainda em transição entre a 2º e a 3º geração e a PacBio RS system (Pacific Biosciences) (KAUR; MALIK, 2013).

As plataformas de segunda geração, tem por princípio inicial, preparar as bibliotecas com o DNA que será sequenciado, onde o mesmo é clivado e os fragmentos de tamanho específico são então selecionados para ligar-se a adaptadores nas duas extremidades (MOREIRA, 2015).

As tecnologias de sequenciamento de terceira geração, vem com a promessa de redução de custos e novamente prometem revolucionar a ciência genômica. Ainda em fase de desenvolvimento e muito discutida, há divergências por considerar os sequenciadores de terceira geração, tecnologias sem o uso de luz ou fluorescência, como também alguns defendem o conceito de sequenciar fragmentos maiores do que os atualmente sequenciados (MOREIRA, 2015). As novas tecnologias de alto rendimento, como genômica, metagenômica, transcriptômica e metatranscriptômica foram promovidas pelas técnicas SNG. São duas as formas diferentes de como estas tecnologias podem ser usadas:

- a) Sequenciamento *shotgun*: sequenciamento total dos ácidos nucleicos;
- b) Sequenciamento direcionado: quando o sequenciamento é específico do gene (MAYO, et al., 2014).

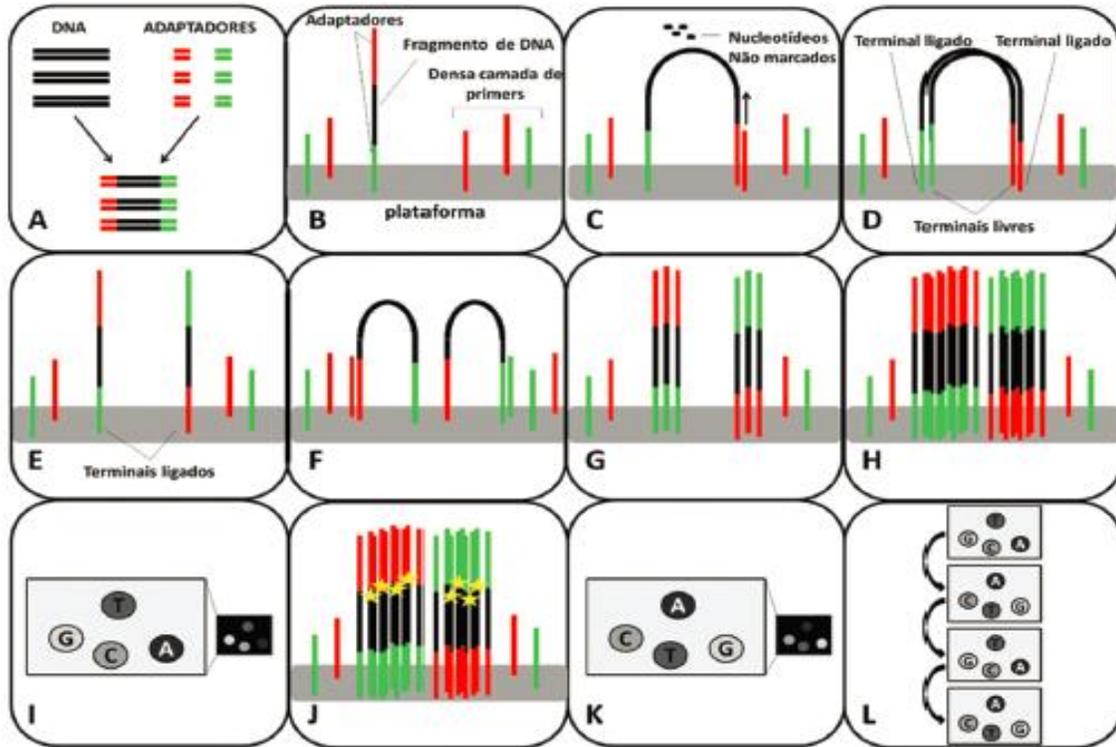
A tecnologia da plataforma Illumina, de segunda geração, utilizada neste trabalho, utiliza *primers* com adaptadores específicos que complementam o DNA. O DNA é amplificado por PCR, permitindo que o DNA clonal permaneça ligado aos iniciadores. Através da síntese, o sequenciamento prossegue com iniciadores complementares e quatro nucleotídeos terminadores (RT), reversivelmente bloqueados. O corante, junto com o bloqueador terminal 3', é então quimicamente removido do DNA, permitindo sua incorporação e detecção, e para o próximo ciclo de sequenciamento. Além disso, a aquisição de imagens pode ser retardada a partir da incorporação de nucleotídeos, permitindo que matrizes muito grandes de *clusters* de DNA, sejam capturadas por imagens sequenciais tomadas por uma única câmera. Atualmente, a plataforma Illumina gera leituras típicas de 150-300 pb, que podem ser aumentadas para 300-600 pb via sequenciamento “emparelhado” (ou seja, sequenciamento de ambas as extremidades do

mesmo *cluster* de DNA). O preço reduzido para a alta produção de sequências por corrida (até 3000 Mb para o HiSeq) é a maior vantagem dessa tecnologia.

Neste equipamento é necessário preparar as bibliotecas contendo o DNA a ser sequenciado, e podem ocorrer de duas formas: *paired-end* que disponibiliza o sequenciamento nas duas extremidades de *reads* de tamanhos entre 200 e 500 nucleotídeos. A *mate-pair*, é a outra forma, que necessita de um passo extra para sequenciar também as duas extremidades de *reads* entre 2000 a 5000 nucleotídeos. Este passo extra aumenta a eficiência da ligação das extremidades dos fragmentos maiores na placa de vidro. O desenvolvimento do kit pela Illumina, direciona a montagem de regiões repetidas, como também proporcionar a ligação e ordenação dos contigs (MOREIRA, 2015).

Para determinar uma base de sequenciamento de forma suficiente, é necessário produzir intensamente um número elevado de fragmentos no *clusters* (maior que um milhão). Há uma captura de imagem com fluorescência para cada posição dos *clusters* na placa de vidro, onde na sequência ocorre o desbloqueio da extremidade 3' e a remoção dos reagentes e do fluoróforo incorporados no ciclo anterior ao nucleotídeo, permitindo então que um novo ciclo se inicie. O esquema de sequenciamento de DNA pela a técnica Illumina pode ser visualizado na figura 3.

Figura 3 - Esquema do princípio da técnica Illumina.



Em (A) ocorre a fragmentação do DNA a ser sequenciado, com posterior seleção dos fragmentos de tamanho apropriado e ligação de adaptadores em ambas as extremidades. Em (B), estes fragmentos são colocados em uma placa de vidro (*flowcell*) com concentração alta de adaptadores complementares (*primers*), aos adaptadores contidos nas extremidades dos fragmentos, de maneira que os fragmentos possam então se ligarem à placa. Em (C), ocorre a incorporação de nucleotídeos não marcados com fluorescência até que toda a extensão do fragmento seja amplificada. Em (D) ocorre a formação da estrutura em ponte, evidenciando dois adaptadores presos a placa e outros dois livres. Em (E) ocorre a desnaturação do duplex. Em (F) os adaptadores livres se ligam a adaptadores complementares na placa, iniciando um novo ciclo. Em (G), temos o cluster sendo formado, o qual provavelmente conterá mais de um milhão de cópias do mesmo fragmento. Em (H) adiciona-se os quatro tipos de didesoxinucleotídeos terminadores reversíveis contendo fluoróforos, junto com a enzima DNA polimerase, que fará a incorporação do didesoxinucleotídeo apropriado. A incidência de um feixe de raios laser excita os fluoróforos proporcionando emissão de luz que difere em função da base incorporada. Em seguida, efetua-se uma etapa de lavagem para remoção do grupo bloqueador presente na extremidade 3' junto com o fluoróforo; fato este que permitirá a incorporação do segundo nucleotídeo. Estes ciclos se repetem até que toda a extensão do DNA seja polimerizada. Em "I" ocorre o registro da imagem correspondendo a incorporação do primeiro didesoxinucleotídeo. "J" e "K" representam sucessivos ciclos de incorporação de didesoxinucleotídeos marcados, incidência de raios laser, emissão de luz e registro da imagem. Por fim, em "L", as imagens registradas em cada ciclo são decodificação para determinar a sequência de bases de cada cluster na placa.

Fonte: (MOREIRA, 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da UDESC/Pinhalzinho – SC, no SENAI/Chapecó e na Neoprospecta Microbiome Technologies/Brasil.

A alface (*Lactuca sativa* L.) variedade *crispa*, proveniente de cultivo tradicional, foi gentilmente doada pela Scussel Verduras, agroindústria de minimamente processados de Chapecó/SC.

No estudo foram utilizados os sanitizantes à base de dióxido de cloro 80 ppm (Veromax) (v/v), a mistura de dicloroisocianurato de sódio com cloreto de sódio 148 ppm (Clean Veg) (p/v) e hipoclorito de sódio 200 ppm (Q-boa) (v/v). Todos adquiridos no comércio local de Chapecó/SC.

3.1 PREPARO DA AMOSTRA

Para cada etapa do experimento, foram utilizados, aproximadamente 2,5 kg de alface, o qual as folhas foram separadas do talo, homogeneizadas e submetidas aos tratamentos.

Os sanitizantes foram preparados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes. A determinação dos tempos de contato de 0,5, 1,0 e 5,0 minutos entre alface e os sanitizantes, deu-se em função da instabilidade do ácido hipocloroso bem como os tempos utilizados na agroindústria. Utilizou-se para cada tratamento, aproximadamente 200 g de alface. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos.

Tratamentos	Descrição dos tratamentos
A	alface <i>in natura</i> (suja)
AA	alface lavada com água potável
AS (ClO ₂ 0,5 min)	alface imersa em dióxido de cloro (80 ppm)
AS (ClO ₂ 1,0 min)	alface imersa em dióxido de cloro (80 ppm)
AS (ClO ₂ 5,0 min)	alface imersa em dióxido de cloro (80 ppm)
AS (C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃ 0,5 min)	alface imersa em dicloroisocianurato de sódio (148 ppm)
AS (C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃ 0,1 min)	alface imersa em dicloroisocianurato de sódio (148 ppm)
AS (C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃ 5,0 min)	alface imersa em dicloroisocianurato de sódio (148 ppm)
AS (NaClO 0,5 min)	alface imersa em hipoclorito de sódio (200 ppm)
AS (NaClO 1,0 min)	alface imersa em hipoclorito de sódio (200 ppm)
AS (NaClO 5,0 min)	alface imersa em hipoclorito de sódio (200 ppm)

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Após os tratamentos das alfaces com os sanitizantes clorados submetidos a 5 min de contatos, foram coletadas amostras dos sanitizantes para avaliar o pH e cloro residual livre mg/L Cl₂.

Alfaces de todos os tratamentos foram submetidas a contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e bactérias ácido lácticas (BAL).

3.2 CONTAGEM MICROBIANA

Pesou-se assepticamente 25g de alface de cada tratamento em sacos estéreis tipo *stomacher*, e adicionou-se 225 mL de água peptonada a 0,1% (p/v), perfazendo a diluição 10⁻¹. A partir desta diluição, preparou-se as demais diluições seriadas.

Para as contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos, utilizou-se método descrito pela ISO 4833:2013 e APHA: 2015, respetivamente. Alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram plaqueadas em Ágar Plate Count Agar - PCA (Merck), e

incubadas a 30°C +/-1°C e 7°C +/-1°C por 72 horas e 10 dias, respectivamente. As colônias foram contadas e o resultado expresso em log UFC.g⁻¹.

As contagens de enterobactérias (EB) e de Bactérias Ácido Láticas (BAL) foram realizadas de acordo com AOAC 2003.01 e AOAC RI 41701, respectivamente. Inoculou-se 1mL das diluições selecionadas em placas de Petrifilm™ de EB e BAL. Incubou-se a 37°C ± 1°C por 24 h ± 2 h para EB e 48 h ± 3 h para análise de BAL. As colônias foram contadas e o resultado expresso em log UFC.g⁻¹.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As contagens obtidas para mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL foram submetidas análise de variância seguida do teste de Tukey (p<0,05), utilizando-se o software *Statistica* versão 10.0.

3.4 CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, ENTEROBACTÉRIAS E BAL EM ALFACE APÓS A SANITIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO

Identificou-se através da análise estatística, que o melhor tratamento na redução da microbiota em alface foi hipoclorito de sódio 200 ppm por 0,5 minutos (Tratamento AS (NaClO 0,5 min)).

Para avaliar o efeito do sanitizante, temperatura e tempo de armazenamento sobre a microbiota, alface foi preparada conforme descrito em 3.1 e submetida ao tratamento AS (NaClO 0,5 min) com melhor desempenho. Após, realizou-se o enxágue em água potável, centrifugou-se e acondicionou-se 100 g de alface em cada saco de polietileno de baixa densidade (PEBD). Armazenou-se em 2 e 8°C, por 15 e 6 dias, respectivamente.

Nos tempos, logo após o preparo das amostras (zero), cinco, dez e quinze dias de armazenamento a 2°C, bem como nos tempos zero, três e seis dias de armazenamento a 8°C, as alfaces foram submetidas a contagem de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL conforme descrito anteriormente no item 3.2 Os

experimentos foram realizados em triplicata. As contagens dos micro-organismos foram submetidas a análise estatística conforme descrito no item 3.3.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DA ALFACE RESISTENTE AO PROCESSO DE SANITIZAÇÃO BEM COMO DURANTE O ARMAZENAMENTO ATRAVÉS SNG

Amostras de alface *in natura* e alface sanitizada, bem como das alfaces armazenadas durante 15 e 6 dias, a 2 e 8 °C, respectivamente, foram encaminhadas para o laboratório Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis – SC, Brasil.

Os DNAs das amostras foram extraídos e submetido ao sequenciamento (*single-end*) em equipamento MiqSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) com o kit V2, 300 ciclos. Para a amplificação foram utilizados os *primers* para região V3/V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG, WANG & QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, CAPORASO et al, 2012). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados Silva (<https://www.arb-silva.de/>).

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL PELO SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Para isto, utilizou-se isolados de BAL do ágar MRS, estes foram recuperados em caldo BHI e incubados a 35°C por 24h. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega). A qualidade do DNA foi verificada gel de agarose 1% utilizando GelRed 20 X (Biotium Inc., Hayward, USA) e visualizada sob luz UV em transiluminador pelo programa LPix Image (LOCCUS Biotecnologia, BRL®).

A PCR foi realizada para amplificação parcial do gene 16S das regiões variáveis V1 e V2, utilizando os oligonucleotídeos plb16 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') /mlb16-R (5' GGCTGCTGGCACGTAGTTAG 3'), descritos por Kullen et al. (2000). Cada reação de 50µL de PCR foi constituída de 25µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, aproximadamente 200 ng de DNA e água ultra-pura (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA) até completar

o volume final. A reação foi conduzida em termociclador (ESCO Peltier Technology Aeris™, USA) sob as seguintes condições: 5 min a 94°C; 35 ciclos de 15seg a 94°C + 15 seg a 55°C + 1 min a 72°C; extensão final 10 min a 72°C. Os produtos da PCR foram adicionados ao corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, e visualizados sob luz UV em transiluminador L. Pix Image HE (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil). Os produtos de PCR que apresentaram 500 pb, esperado foram submetidos a purificação utilizando o kit “Wizard® SV Gel & PCR Clean-Up” (Promega).

O seqüenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram marcados utilizando-se 5,0 pmol do primer mlb16 5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG -3' e 1 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) e eletro injetadas no sequenciador automático. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados depositado no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) por meio do software “Basic Alignment Search Tool” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir são apresentados os resultados e discussões desta pesquisa.

4.1 CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, ENTEROBACTÉRIAS E BAL EM ALFACE

Na Tabela 2 estão apresentadas as contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface *in natura* e alface submetidos às etapas de lavagem e sanitização com sanitizantes clorados.

Dos grupos de micro-organismos avaliados, obteve-se maior concentração de mesófilos, seguido de psicrotróficos, enterobactérias e BAL na alface (Tabela 2). A presença destes grupos de micro-organismos é comum em alface, haja visto que, estes são expostos ao ambiente de cultivo como o solo, irrigação e manuseio comumente reservatórios destes micro-organismos (BERGER et al., 2010; MAFFEI, et al. 2016).

Tabela 2 - Média das contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface *Lactuca sativa* L. variedade *crispa in natura* e submetida aos tratamentos com sanitizantes clorados, dióxido de cloro (ClO₂), dicloroisocianurato de sódio (C₃CL₂N₃NaO₃) e hipoclorito de sódio (NaClO) nos tempos 0,5, 1,0 e 5,0 minutos

Tratamentos	Contagem (Log UFC.g ⁻¹)			
	Mesófilos	Psicrotróficos	Enterobactérias	BAL
A	6,81±0,12 ^a	6,64±0,50 ^a	4,78±1,69 ^a	2,72±0,78 ^a
AA	6,13±0,56 ^{ab}	4,75±1,48 ^{ab}	3,70±0,62 ^{ab}	1,82±0,75 ^{ab}
AS (ClO ₂ 0,5 min)	5,69±0,11 ^{ab}	4,73±1,12 ^{ab}	3,13±0,71 ^{ab}	1,00±0,00 ^b
AS (ClO ₂ 1,0 min)	5,63±0,54 ^{ab}	4,63±0,73 ^{ab}	3,34±0,48 ^{ab}	1,00±0,00 ^b
AS (ClO ₂ 5,0 min)	5,81±0,19 ^{ab}	4,43±0,43 ^{ab}	2,84±1,09 ^{ab}	1,00±0,00 ^b
AS (C ₃ CL ₂ N ₃ NaO ₃ 0,5 min)	5,00±0,47 ^{abc}	3,92±0,09 ^b	2,97±0,43 ^{ab}	1,00±0,00 ^b
AS (C ₃ CL ₂ N ₃ NaO ₃ 1,0 min)	4,76±1,00 ^{abc}	3,88±0,44 ^b	2,37±0,71 ^{ab}	1,00±0,00 ^b
AS (C ₃ CL ₂ N ₃ NaO ₃ 5,0 min)	4,47±0,88 ^{bc}	3,70±0,59 ^b	1,10±0,17 ^b	1,00±0,00 ^b
AS (NaClO 0,5 min)	3,83±1,01 ^c	4,14±0,72 ^b	2,49±1,45 ^{ab}	1,00±0,10 ^b
AS (NaClO 1,0 min)	3,45±1,30 ^c	3,71±0,21 ^b	1,91±1,33 ^b	1,00±0,00 ^b
AS (NaClO 5,0 min)	3,28±0,54 ^c	2,98±0,94 ^b	1,49±0,84 ^b	1,00±0,00 ^b

*Médias e desvio padrão seguidas da mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente dos tratamentos. A: alface *in natura*; AA: alface lavada com água potável; AS: alface lavada com água potável e imersa no sanitizante clorado em determinado tempo.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Observa-se na Tabela 2, que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a média das contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface *in natura* e alface submetida a lavagem com água potável (tratamento AA). Este resultado demonstra que a água potável utilizada na lavagem da alface não reduziu os grupos de micro-organismos avaliados, no entanto pode interferir na redução da matéria orgânica e consequentemente favorecer o processo de sanitização. De acordo com Van Haute et al., (2013), o cloro residual livre presente na água potável (mínimo de 0,2 mg. L⁻¹), pode reagir com a matéria orgânica presente nas folhas do vegetal e ser consumido, desta forma, não está disponível para agir contra os micro-organismos.

Silveira et al., 2017, verificaram redução de 0,97 log UFC.g⁻¹ de *Salmonella* Enteritidis SE86 em alface após a lavagem com água potável. Esta diferença de resultado entre nosso estudo e Silveira et.al 2017, pode ser explicado, devido a alface ter sido inoculada com 5 log UFC.g⁻¹ de *S. Enteritidis* e, após 30 minutos foi submetida a lavagem com água potável. O tempo de 30 min pode não ter sido suficiente para que o micro-organismo se aderisse a superfície das folhas, desta forma, houve a redução de *S. Enteritidis* quando submetido a lavagem.

Conforme CDC, (2018), os vegetais minimamente processados são responsáveis pela transmissão de doenças. A maioria dos micro-organismos patogênicos, causadores de doença são mesófilos, ou seja, multiplicam em temperaturas próximas a 36°C (ICMSF, 2015).

A maior redução nas contagens de micro-organismos mesófilos foi de 3,53 logUFC.g⁻¹ em alface submetida às etapas de lavagem com água potável, e submetida ao hipoclorito de sódio 200 ppm por 5,0 minutos. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as contagens de mesófilos em alfaces lavadas com água potável e submetidas a imersão em hipoclorito de sódio 200 ppm entre os tempos 0,5, 1,0 e 5,0 min (Tabela 2). Com este resultado, podemos inferir que, o tempo de contato da alface com o hipoclorito de sódio não influencia na contagem de micro-organismo mesófilos. Outro fato importante, e que pode explicar este resultado, é que o hipoclorito de sódio se dissocia em água e forma o ácido hipocloroso, este último que atua como germicida e sua ação ocorre instantaneamente (WHO, 2011). O ácido hipocloroso possui alta capacidade oxidativa, quando em contato com as proteínas da membrana das células microbianas, pode interferir no transporte de nutriente, levando a morte celular. (VANETTI, 2004; POSSAMAI, 2014).

Resultados diferentes foram descritos por Gomes Neto et al., (2012), onde avaliaram alface cultivadas em sistema orgânico, tradicional e hidropônico e submetida aos tratamentos de lavagem com água destilada e imersão em hipoclorito de sódio 150 mg. L⁻¹ por 15 min, e obtiveram redução média de 5,38 logUFCg⁻¹ nas contagens de micro-organismos mesófilos. Esta diferença de resultado pode ser explicada, devido no estudo de Gomes Neto et al., (2012) utilizaram o hipoclorito de sódio em tempo de contato superiores do que avaliado neste estudo.

Observa-se na Tabela 2, que o dióxido de cloro a 80 ppm, não reduziu significativamente ($p > 0,05$) as contagens de mesófilos, psicrotróficos e enterobactérias, independentemente do tempo de contato que a alface foi submetida (tratamentos AS (ClO_2 0,5, 1,0 e 5,0 min.), quando comparadas as contagens obtidas na alface *in natura* e na alface lavada com água potável (Tabela 2). No entanto, obtivemos redução significativamente ($p < 0,05$) nas contagens de BAL entre alface submetida ao dióxido de cloro, independentemente do tempo de contato, e a alface *in natura*.

Tomás-Callejas et al., (2012) descrevem este comportamento, onde o dióxido de cloro impediu o desenvolvimento de *E. coli* O157:H7 previamente inoculado em alface, porém não se mostrou eficaz na eliminação do patógeno *Salmonella* spp., também simulado por adição nestes vegetais.

Segundo Andrade, (2010), a ação do dióxido de cloro está relacionada a oxidação dos componentes da parede celular dos micro-organismos, em especial lipídios e proteínas, proporcionando a ruptura desta, com consequente desintegração da mesma. A eficiência do sanitizante depende da microbiota, principalmente da composição da parede celular dos micro-organismo presente na matriz alimentar, como também pelos fatores intrínsecos e extrínsecos inerentes ao processo, como por exemplo, atividade de água, pH e constituintes (USEPA, 1999; FINCH; BELOSEVIC, 2002).

Observa-se na tabela 2, que os sanitizantes clorados independente dos tempos de imersão da alface, não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) na redução das contagens de micro-organismos psicrotróficos entre alface após a lavagem com água potável (Tratamento AA). No entanto, percebe-se uma redução significativa entre as contagens de psicrotróficos em alface *in natura* e alface lavada e sanitizada com dicloroisocianurato de sódio e hipoclorito de sódio, nos tempos de contatos de 0,5, 1,0 e 5,0 min. Este resultado demonstra que a lavagem da alface é uma etapa importante para que a sanitização seja eficiente.

As enterobactérias pertence a família de *Enterobactereacea*, o qual é composta por um grande grupo heterogêneo de bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas, entre eles, destaca-se os gêneros *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., e *Shigella* spp. de importância a saúde pública (RUSTAM et. al., 2006).

Os sanitizantes dicloroisocianurato de sódio (148 ppm) e hipoclorito de sódio (200 ppm) reduziram significativamente ($p < 0,05$) as contagens de enterobactérias entre alface *in natura* e submetidas aos sanitizantes por tempo de 0,5, 1,0 e 5,0 minutos, respectivamente. Houve redução de 3,68 e 2,87log nas contagens de enterobactérias utilizando os sanitizantes dicloroisocianurato de sódio (148 ppm) e hipoclorito de sódio (200 ppm), respectivamente.

Considerando que a legislação brasileira não estabelece padrão para enterobactérias em vegetais minimamente processados, mas, no entanto, estabelece limites de 2 log UFC g⁻¹ para coliformes termotolerantes (BRASIL, 2001). Considerando este limite, as alfaces submetidas ao dicloroisocianurato de sódio (148 ppm) por 5,0 min e ao hipoclorito de sódio (200 ppm) por 1,0 e 5,0 min, estariam dentro do padrão.

As BALs fazem parte da microbiota natural de frutas e vegetais, a maioria dos micro-organismos pertencente a este grupo, não apresentam riscos à saúde humana, por isso muitos são reconhecidas como seguras GRAS (Generally Recognized As Safe), (GAISER et al., 2011; ZHAN et al., 2012). As BAL contribuem com características probióticas, sensoriais em ampla variedade de produtos curados e fermentados, além de representar a capacidade de produzir substâncias com propriedades antimicrobianas. No entanto, as podem causar a deterioração em vegetais, provocando a desorganização da estrutura vegetal durante sua vida útil.

Na tabela 2, observa-se que este grupo bacteriano apresentou maior sensibilidade aos sanitizantes clorados testados em alface, não sendo possível quantificar pela metodologia tradicional de contagem em placas. Os autores Marin, et al., (2010) também estudaram a quantificação de BAL em alface em 2, 6 e 9 dias de vida útil, armazenadas a 4°C, e devido a sanitização adequada com cloro ativo de 100 ppm por 15 minutos não apresentaram contagens microbiológicas para este grupo bacteriano.

Os micro-organismos psicotróficos apresentam importância quanto ao risco de contaminação por patógenos, haja visto que, pode estar associado à presença de *L. monocytogenes*. Outro aspecto importante, é que os micro-organismos psicotróficos são resonsáveis pela deterioração de vegetais, contagens elevadas destes grupos podem contribuir para redução da vida de prateleira de VMP (BRUNO, et al., 2005).

Dentre os grupos de micro-organismos avaliados, os mesófilos e as enterobactérias são de maior importância em saúde pública, devido estes micro-organismos estarem vinculados às DTAs. Dos compostos clorados avaliados o hipoclorito de sódio na concentração 200 ppm apresentou melhor desempenho na redução de micro-organismos mesófilos e enterobactérias em alface.

4.2 EFEITO DO SANITIZANTE, TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A MICROBIOTA DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, ENTEROBACTÉRIAS E BAL

Na Tabela 3 estão apresentados a média das contagens de micro-organismos mesófilos, psicotróficos, enterobactérias e BAL em alface sanitizada com hipoclorito de sódio 200 ppm, e armazenadas por 15 e 6 dias a 2°C e 8°C, respectivamente.

Tabela 3 - Contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, psicotróficos, enterobactérias e BAL (log UFC-1) em alface armazenada à 2°C e 8°C por 15 e 6 dias, respectivamente.

		Tempo (dias)	Contagem (log UFC.g ⁻¹)		
			Mesófilos	Psicotróficos	Enterobactérias
Temperatura 2°C	0	2,65 ± 0,048 ^a	2,74 ± 0,039 ^a	2,38 ± 0,265 ^a	
	5	3,04 ± 0,040 ^{ba}	3,02 ± 0,020 ^{bc}	1,74 ± 0,040 ^b	
	10	3,06 ± 0,057 ^{cb}	3,13 ± 0,048 ^{cb}	1,00 ± 0,001 ^c	
	15	3,47 ± 0,029 ^d	3,59 ± 0,044 ^d	1,00 ± 0,001 ^c	
Temperatura 8°C	0	2,74 ± 0,040 ^a	2,39 ± 0,088 ^a	1,65 ± 0,048 ^a	
	3	3,14 ± 0,063 ^b	3,37 ± 0,118 ^b	2,39 ± 0,177 ^b	
	6	3,57 ± 0,035 ^c	3,83 ± 0,112 ^c	2,85 ± 0,146 ^c	

*Médias e desvio padrão com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância. **Para BAL os resultados foram <1,0 x 10 UFC.g⁻¹.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Verifica-se na tabela 3, que mesmo utilizando temperaturas baixas no armazenamento de alface, como de 2 e 8°C, há a multiplicação de micro-organismos mesófilos e psicotróficos. No entanto, há aumento na média das contagens deste micro-

organismos, quando as alfaces foram armazenadas a 8°C. Este resultado demonstra, que a temperatura de armazenamento da alface influencia diretamente na multiplicação de micro-organismos, principalmente dos psicrotróficos. Ressalta-se que os psicrotróficos são os principais micro-organismos responsáveis pela redução da vida útil de alimentos refrigerados (ANTONIOLLI et al., 2005).

Autores como Waghmare e Annapure (2015) e Bachelli (2013), relatam o mesmo comportamento, o aumento de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, em vegetais sanitizados e armazenados em temperatura de refrigeração.

Quanto as enterobactérias, pode-se observar na tabela 3, que houve redução de 1,38 log UFC.g⁻¹ na média das contagens em alface sanitizada com hipoclorito de sódio 200 ppm e armazenada à 2°C por 15 dias. No entanto, quando a alface foi armazenada a 8°C por seis dias, houve aumento de 1,20 log UFC.g⁻¹ nas contagens deste micro-organismos. Evidencia-se que após o processo de sanitização da alface, o armazenamento a 2°C é uma alternativa no controle da multiplicação de enterobactérias.

De acordo com Vanetti, et al., (2004), o armazenamento refrigerado de vegetais, sob controle de temperatura, reduz as condições metabólicas e enzimática fazendo com que, a taxa de crescimento bacteriano seja reduzida, prolongando assim a vida útil destes produtos.

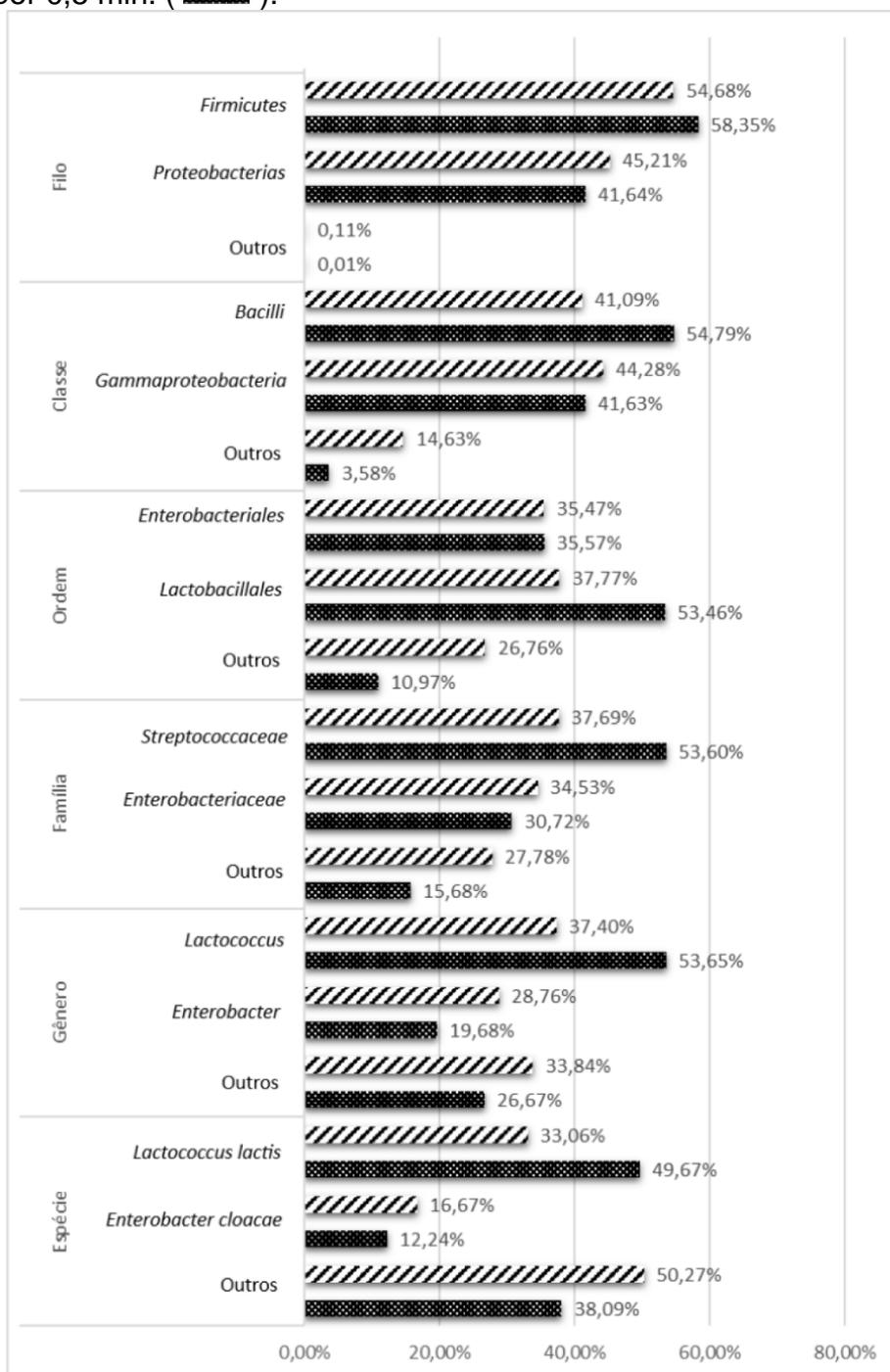
A média das contagens de BAL em alface se mantiveram constantes, após a sanitização com hipoclorito de sódio 200 ppm, durante 15 e 6 dias, a 2°C e 8°C, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as médias das contagens de BAL em alface sanitizada entre os tempos de armazenamento.

Resultados semelhantes foram relatados por López-Gálvez, et al., (2013) e Gómez-López, et al., (2007), onde não houve crescimento de BAL em alface minimamente processada e armazenada em temperatura de refrigeração de 5°C e 7°C, respectivamente.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DA ALFACE ATRAVÉS DO SNG

Na figura 4, pode-se visualizar a diversidade das microbiotas da alface *in natura* (suja) e da alface lavada e submetida ao hipoclorito de sódio (200 ppm) por 0,5 min.

Figura 4 - Identificação do Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e espécie (%) na microbiota da alface *in natura* (//) e na alface sanitizada com hipoclorito de sódio (200 ppm) por 0,5 min. (■).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Na alface *in natura* (suja) e na alface sanitizada com hipoclorito de sódio (200 ppm) foram identificadas 454059 e 346004 sequências ou *reads*, respectivamente. Este

resultado revela que, a microbiota da alface *in natura* é maior do que da alface sanitizada com hipoclorito de sódio.

Os principais filos identificados nas microbiotas da alface *in natura* (suja) e da alface sanitizada foram *Firmicutes* e *Proteobacteria*, com frequência de 54,68% e 58,35% e 45,21%, e 41,64%, respectivamente. Resultados semelhantes foram descritos por Rastogi, et al., (2012) e Williams, (2013), onde identificaram como os filos mais expressivos as *Proteobacteria* e *Firmicutes*.

Na microbiota da alface *in natura* e da alface sanitizada foram identificados 12 e 11 classes, respectivamente, com a predominância de *Bacilli* e *Gammaproteobacteria*.

Em relação classificação da microbiota da alface *in natura* e da alface sanitizada quanto a ordem, foram identificadas em 27 e 20, respectivamente, os quais, predominaram *Enterobacteriales*, *Lactobacillales*, *Aeromonadales*, *Bacillales*, *Clostridiales* e *Pseudomonadales*.

Quanto aos resultados taxonômicos de famílias identificadas na alface *in natura* e alface sanitizada, houve o predomínio de *Streptococcaceae* com 37,69% e 53,60% e *Enterobacteriaceae* com 34,53% e 30,72%, respectivamente.

A família *Streptococcaceae* é constituída por bactérias ácido lácticas que fazem parte da microbiota natural de vegetais. A família da *Enterobacteriaceae* não faz parte da microbiota natural da alface, porém estão presentes em adubo orgânico, solo e água utilizada no cultivo desta hortaliça (ICMSF, 2015).

Na microbiota da alface *in natura* e da alface sanitizada foram identificados 145 diferentes gêneros e 751 espécies. Os gêneros *Lactococcus* spp e *Enterobacter* spp predominaram nas microbiotas da alface *in natura* e da alface sanitizada (Figura 3). Estava também presente os gêneros *Peptoclostridium* spp., *Pantoea* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. *Lysibacillus* spp. e *Citrobacter* spp.

Resultados diferentes foram relatados por Rastogi, et al., (2012) onde identificaram como os gêneros mais expressivos na microbiota da alface *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Massilia* spp., *Arthrobacter* spp. Esta diferença de resultado quanto a presença de gêneros na microbiota da alface pode ser explicada pela origem da matriz alimentar.

As bactérias lácticas do gênero *Lactococcus*, e a espécie *Lactococcus lactis* predominaram nas alfaces *in natura* (suja) e sanitizada. No entanto, identificou-se menor

concentração da espécie na microbiota da alface *in natura* do que na alface sanitizada com hipoclorito de sódio 200 ppm (Figura 4). Este resultado demonstra que o *L. lactis* é resistente às condições ambientais bem como a ação do hipoclorito de sódio a 200 ppm.

O *L. lactis* são BAL que quando presente em abundância nos tecidos vegetais podem prevalecer ou mesmo alterar a microbiota natural devido a capacidade de produzir bacteriocinas e outras substâncias antimicrobianas (BROMBERG et al., 2006).

Observou-se neste trabalho, que as BAL estavam presentes em baixas concentrações após o processo de sanitização da alface com hipoclorito de sódio, não sendo possível quantificar pelo método tradicional de contagem em placas (Tabela 3). No entanto, quando a alface foi submetida a extração do DNA total e a identificação da microbiota por SNG, as BAL foram identificadas em maior concentração do que os demais micro-organismos.

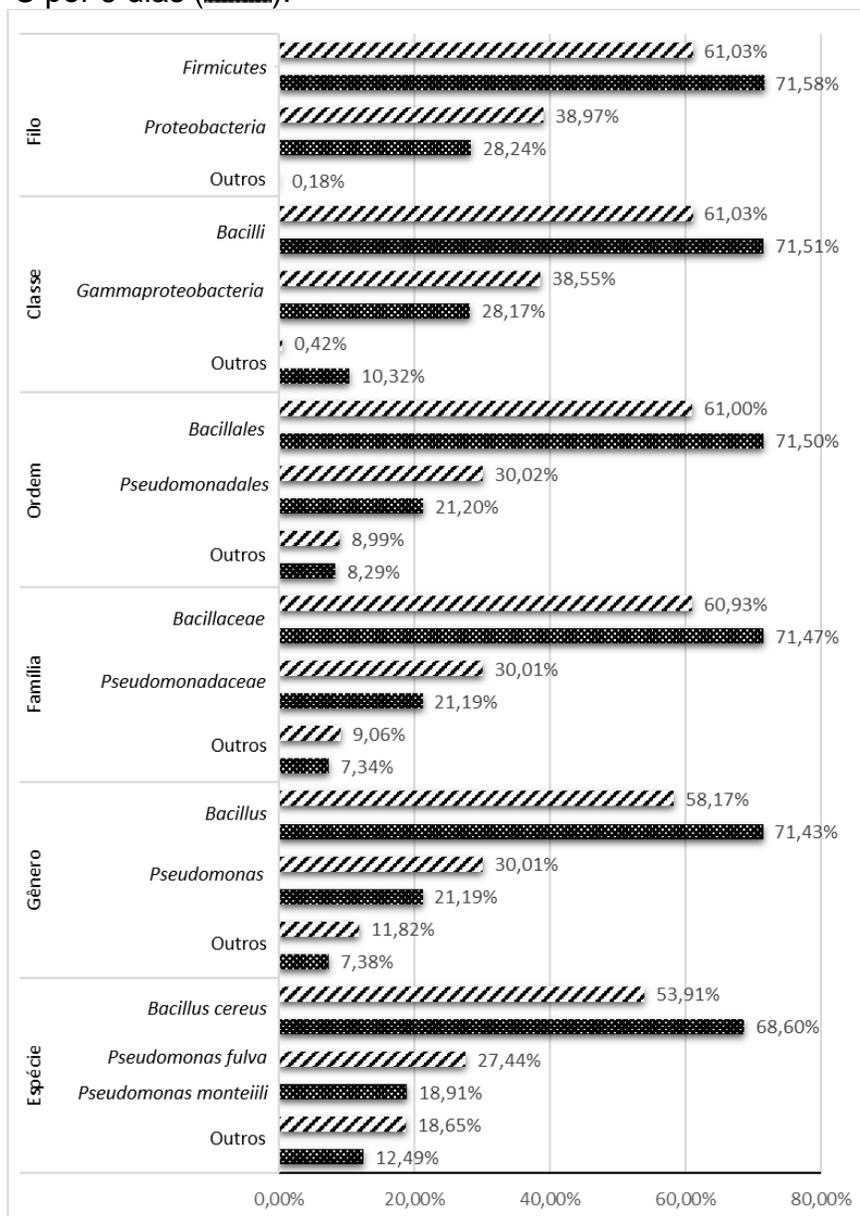
4.4 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DA ALFACE SANITIZADA E ARMAZENADA A 2 E 8°C

Na figura 5 estão apresentados os filos, as classes, as ordens, as famílias, os gêneros e as espécies identificadas na microbiota da alface sanitizada e armazenadas a 2 e 8°C, por 15 e 6 dias, respectivamente.

Observa-se na figura 5, que a temperatura bem como o tempo de armazenamento das alfaces sanitizadas com hipoclorito de sódio, não interferiram na diversidade da microbiota em relação a filo, classe, ordem, família e gênero.

Na alface armazenada à 8°C por 6 dias, foram identificadas quantidades menores de OTUs do que na alface armazenada a 2°C por 15 dias, 99488 e 358168, respectivamente. Esta diferença de resultado, pode ser explicado pela interação sinérgica dos nichos ecológicos, o qual em um período mais longo de tempo, estabelecem suas comunicações, interferindo nas concentrações microbianas.

Figura 5 - Identificação dos Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros e espécies (%) na microbiota da alface sanitizada com hipoclorito de sódio (200 ppm), armazenada a 2°C por 15 dias (////) e da alface sanitizada com hipoclorito de sódio (200 ppm), armazenada a 8°C por 6 dias (■).



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os filos e classes bacterianas predominantes nas microbiotas das alfaces armazenada à 2 e 8°C, durante 15 e 6 dias, foram *Firmicutes* e *Proteobacteria*, e *Bacilli* e *Grammaproteobacteria*, respectivamente. Estes filos e classes foram identificados na microbiota da alface *in natura* e alface submetida ao hipoclorito de sódio por 0,5 min.

Com estes resultados, percebemos que a diversidade da microbiota da alface inicial permanece após a etapa de sanitização e de armazenamento em temperaturas de refrigeração.

Quanto a identificação das ordens e das famílias, prevaleceram na microbiota da alface *Bacillales* e *Pseudomonadales*, *Bacillaceae* e *Pseudomonadaceae*, respectivamente (Figura 5). Consequentemente, prevaleceram os gêneros *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. Conforme a literatura, estes gêneros são os principais causadores da deterioração em alimentos de origem vegetal refrigerados (JAY et al, 2005).

As espécies microbianas em maior concentração identificadas na alface armazenada a 2°C por 15 dias, foram *Bacillus cereus* e *Pseudomonas monteilli* (Figura 5). Na alface armazenada a 8°C por 6 dias, foram identificadas as espécies *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fulva*.

O *Bacillus cereus* é uma bactéria patogênica, anaeróbio facultativo, Gram-positivo, formador de endósporos e produtor de toxinas responsáveis por intoxicações alimentares (GRIFFITHS; SCHRAFT, 2017). Os endósporos de *B. cereus* são resistentes as condições ambientais, tais como altas temperaturas e desidratação. Além disso, os endosporos são hidrófobos, ou seja, aderem a adversas superfícies, resistindo aos procedimentos de limpeza (ABEE et al., 2011). O que explica, a sua permanência na estrutura folicular da alface, após o processo de sanitização.

O gênero *Pseudomonas* spp. está associado a contaminação pela água de irrigações das plantações de vegetais, mas também vem sendo constatado que faz parte da microbiota natural de alfaces (HEATON; JONES, 2007). Estes mesmos autores relataram que o gênero *Pseudomonas* spp. por serem psicrótróficas, estas bactérias são responsáveis pela produção de enzimas pectinolíticas que destroem os tecidos foliares e consequentemente a deterioração destas hortaliças.

Com estes resultados, percebe-se a necessidade de estudos e desenvolvimento de sanitizantes com ação contra micro-organismos esporulados e deteriorantes como *Bacillus cereus* e *Pseudomonas* spp.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL PELO SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Dos 15 isolados de BAL submetidos ao sequenciamento de Sanger, foram identificados como doze *Enterococcus mundtii* (80%), dois *E. galinarum* (13,33%) e um *Lactococcus lactis* com 6,66%. Comparando os resultados obtidos na identificação de gênero e espécies de BAL isoladas de alface pelo sequenciamento de Sanger e pelo SNG, observa-se analogia. No entanto, no SNG os percentuais das espécies presentes foram diferentes, *Lactococcus lactis* representou 82,73%, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus mundtii* com 0,003% da microbiota da alface *in natura* e sanitizada.

Os resultados de BAL puderam ser identificados com melhor expressividade, nos resultados por SNG, pois o método permite detecção ilimitada de micro-organismos sem cultura prévia, fornecendo assim microbioma completo (HASMAN, et al., 2014; JUNEMANN et al., 2013; LOMAN, et al., 2012).

5. CONCLUSÕES

O sanitizante clorado que apresentou melhor eficiência sobre a microbiota da alface *Lactuca sativa* variedade *crispa* foi o hipoclorito de sódio 200 ppm.

A microbiota da alface é constituída pelos micro-organismos aeróbios mesófilos, em maior concentração, seguidos pelos psicrotróficos, enterobactérias e BAL.

O SNG é uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional, permitindo a identificação da microbiota em nível comunitário, com menor custo e rapidez.

Em nível comunitário, predominam na alface *in natura* e na alface após a sanitização com hipoclorito de sódio 200 ppm as espécies: *Lactococcus lactis* e o *Enterobacter cloacae*. Com o SNG permitiu, verificar que a microbiota inicial permanece na matriz alimentar após o processo de sanitização, no entanto em menores concentrações na alface sanitizada.

A temperatura de armazenamento da alface minimamente processada influencia diretamente na multiplicação dos micro-organismos. Houve aumento na microbiota de aeróbios mesófilos, psicrotróficos e enterobactérias em alface minimamente processada e armazenada em temperatura de 8°C em relação a temperatura de 2°C.

Durante quinze e seis dias de armazenamento das alfaces minimamente processadas a 2 e 8°C, respectivamente, houve o predomínio da espécie patogênica *Bacillus cereus*, no entanto em maior concentração na alface (MP) em temperatura de 2°C.

A mudança de espécies predominantes entre alfaces *in natura* e alface (MP) e armazenadas em temperatura de refrigeração está diretamente relacionado com a interação sinérgica dos nichos ecológicos, o qual em período mais longo de armazenamento, estabelecem suas comunicações, interferindo na diversidade e nas concentrações microbianas.

Com os resultados obtidos neste estudo, evidencia-se a importância da identificação da microbiota da alface *in natura* bem como após o processo de higienização e armazenamento, o qual permite avaliar a eficiência do sanitizante. Além disso, permite entender as interações entre os nichos microbianos com a matriz

alimentar, conseqüentemente fomenta o estudo e o desenvolvimento de novas tecnologias para prolongar a vida útil dos vegetais minimamente processados.

REFERÊNCIAS

ABADIAS, M. et al. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p.121-129, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507007222?via%3Dihub>
Acesso em: 12 abr. 2017.

ABCSEM –Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. **3º Seminário Nacional de folhosas, Campinas: 2017**. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/noticias/3368/palestras-3-seminario-nacional-de-folhosas>
Acesso em: 20 Nov. 2017.

ABEE, T. et al. Germination and outgrowth of spores of Bacillus cereus group members: diversity and role of germinant receptors. **Food Microbiol.** v.28, p. 199-208, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010000572?via%3Dihub>
Acesso em: 23 Jun.2018.

AIETA, E.M.; BERG, J. D. A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. **Journal of the American Water Works Association.**v.78, n.6, p.62-72. 1986.

ALLENDE, A. et al. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and its efficacy in reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 24, p. 759-766, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002007000172?via%3Dihub>
Acesso em: 25 out.2018.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology.** V.215, p. 403-410, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605803602?via%3Dihub>
Acesso em: 26 ago.2017.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 18. ed. V. 1. Baltimore: APHA, 2015.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 4. ed. São Paulo: Agrônoma Ceres, 2011. 704 p.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 1996.

ANDRADE, R. C. **Aplicação do dióxido de cloro no tratamento de água para consumo humano: desinfecção para controle de oocistos de *Cryptosporidium* sp, formação de subprodutos e manutenção de residuais desinfetantes em sistemas de distribuição**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia civil, Universidade Federal de Viçosa, MG, 2010.

ANTONIOLLI, L. R. et al. Influência da posição e formato de corte na preferência sensorial de abacaxi 'Pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 511-513, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v27n3/27809.pdf> . Acesso em: 14 jun.2018.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD. 2000.

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**. V. 44, n. 3, p. 673-678, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910173/> . Acesso em: 03 mai.2017.

BANACH, J. L. et al. Effect of Disinfectants on Preventing the Cross-Contamination of Pathogens in Fresh Produce Washing Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. V.12, p. 8658-8677, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/12/8/8658> Acesso em: 17 mai.2017.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p.353-359, 1999.

BEUCHAT, L.R.; ADLER, B.B.; LANG, M.M. Efficacy of Chlorine and a Peroxyacetic Acid Sanitizer in Killing *Listeria monocytogenes* on Iceberg and Romaine Lettuce Using Simulated Commercial Processing Conditions. **Journal of Food Protection**.V. 67, n. 6, p. 1238-1242, 2004. Disponível em: <http://foodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-67.6.1238> . Acesso em: 01 fev. 2017.

BERG, J. D.; ROBERTS, P. V.; MATIN, A. Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 60, n. 3, p. 213-220, 1986.

BOTH, J.M.C.; LONGARAY, S.M.; AVANCINI, C.A.M. O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente a *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 254-258, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária – ANVISA. **Portaria nº 326 de 30 de julho de 1997**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0326_30_07_1997.html. Acesso em 20 nov. 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254. Acesso em: 02 nov. 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b . Acesso em: 15 mai.2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. **Resolução RDC nº14, de 28 de fevereiro de 2007**. Aprova regulamentos técnicos saneantes. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_14_2007.pdf/3eda65f3-5e07-40b5-b3fb-c85bfdcabec6. Acesso em 02.nov.2018.

BRASIL, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. **Portaria SES nº 90 de 13 de fevereiro de 2017**. Regulamento técnico de boas práticas de fabricação e de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos Produtores/industrializadores de frutas e vegetais minimamente processados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Porto Alegre, RS, 13 fev. 2017. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20170437/13053734-1489756663-90-cevs.pdf> . Acesso em: 22 fev.2018.

BRASIL, 2017. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde. Acesso em 22.04.2018 às 12:40. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>.

BROMBERG, R. et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100023 . Acesso em: 11 Mar. 2018.

BRUNO, L. M. et al. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). **B. CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 75-84, 2005. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1272/1066> . Acesso em: 11 set. 2017.

CAPORASO, J.G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**. V. 6, p. 1621-1624, 2012. Disponível em: < <https://www-ncbi-nlm-nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC3400413/>>. Acesso em: 10 Mai. 2018.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D.C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, mar, 2010.

CDC (2018). **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-04-18/index.html> . Acesso em: 04 Set. 2018.

CFIA – Canadian Food Inspection Agency.2018. Disponível em : <http://www.inspection.gc.ca/food/fresh-fruits-and-vegetables/food-safety/minimally-processed-ready-to-eat-fruit-and-vegetab/eng/1413673339210/1413673388676?chap=0>. Acesso em 02 Nov.2018.

CHAGAS, F. DAS. et al. Controle biológico em sistema orgânico de produção por agricultores da cidade de Maringá (Paraná, Brasil). **Ciência e Natura**, Santa Maria v.38 n.2, p. 637-647, 2016.

COSTA, E.A. et al. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca Sativa* L.) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização. **Alimentos e Nutrição.**, Araraquara v. 23, n. 3, p. 387-392, 2012.

CZARNESKI, M. Selecting the right chemical agent for decontamination of rooms and chambers. **Applied Biosafety**, v.12, n. 2, p. 85–92, 2007. Disponível em: http://www.deconologic.com/assets/selecting_right_agent.pdf . Acesso em: 02, out.2017.

EFSA – European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads). **EFSA Journal**, v. 12, n. 3, p. 1-118, 2014. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3600> . Acesso em: 17 jun,2017.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**. V. 13, n. 2, p. 113-117, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bdj/v13n2/v13n2a07.pdf> . Acesso em:03 jun.2018.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. São Paulo (SP): Atheneu, 2000, p.652.

FDA – U.S. Food and Drug Administration. 2018. **Code of Federation Regulations Title 21 (CRF part 178)**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=178>. Acesso em: 29 out. 2018.

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**. V. 20, n. 2, p.195-200, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hb/v20n2/14447.pdf> . Acesso em: 04 mai. 2017.

FINCH, G.R.; BELOSEVIC, M. Controlling *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp.in drinking water by microbial reduction processes. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v.1, n.1, p.17-31, 2002.

FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, p. 496-512, 1995. Disponível em:

<http://science-sciencemag-org.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/sci/269/5223/496.full.pdf> . Acesso em: 18 jul.2017.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamentos de recursos humanos**. 3. ed. Rev. ampl. Barueri: Manole, São Paulo. 2008. v.1, 986p.

GIL, M. I. et al. Pre- and Postharvest Preventive Measures and Intervention Strategies to Control Microbial Food Safety Hazards of Fresh Leafy Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. V. 55, n.4, p. 453-468, 2015.

GIL, M. I. et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**. V.134, p. 37-45, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050900289X> . Acesso em: 03 mai. 2017.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.M. et al. Postharvest handling conditions affect internalization of Salmonella in baby spinach during washing. **Journal of Food Protection**. V. 76, n. 7, p. 1145-1151, 2013. Disponível em: <http://web-b-ebscobhost.ez74.periodicos.capes.gov.br/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=0d929c16-f01c-43e8-921f-c87692f9b30b%40pdc-v-sessmgr05> . Acesso em: 27 mai.2017.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.M. et al. Shelf-life extension of minimally processed carrots by gaseous chlorine dioxide. **International Journal of Food Microbiology**. V.116, p. 221-227, 2007. Disponível em: https://ac-els-cdn.ez74.periodicos.capes.gov.br/S0168160507000219/1-s2.0-S0168160507000219-main.pdf?_tid=7b157ecd-8dce-4cde-8890-ac1416cad3b4&acdnat=1548028586_42d0bbb4b09a8d68331830182bceab00 . Acesso em: 11 abr. 2017.

GOMES NETO, N. J. et al. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. **Food Control**. V. 28, p. 47-51, 2012. Disponível em: https://ac-els-cdn.ez74.periodicos.capes.gov.br/S095671351200206X/1-s2.0-S095671351200206X-main.pdf?_tid=b42a4ebd-d43f-4623-acfa-3f9d52015020&acdnat=1548028792_d5d4e5f4811923c11011f56d246654c0 . Acesso em: 02 out. 2017.

GONZALEZ, R.J. et al. Efficacy of Sanitizers To Inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh-Cut Carrot Shreds under Simulated Process Water Conditions. **Journal of Food Protection**. V. 67, n. 11, p. 2375-2380, 2004. Disponível em: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-67.11.2375> . Acesso em: 27 fev.2017.

GRIFFITHS, M. W.; SCHRAFT, H. *Bacillus cereus* Food Poisoning. **Foodborne Diseases**. 3 ed. Elsevier Inc., London. Cap. 20, 2017, p.395-405.

HASMAN, H. et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 52, p.139-146, 2014. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/52/1/139> . Acesso em: 15 mai.2017.

HEATON, J. C.; JONES, K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review. **Journal of Applied Microbiology**. V.104, p. 613-626, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x> . Acesso em: 03. Nov.2018.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Microrganismos em alimentos 8: utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação do produto**. Tradução de Bernardette D.G.M. Franco, Marta H.Taniwaki, Mariza Landgraf, Maria Teresa Destro. São Paulo: Blucher, 2015, p. 552.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION -ISO 4833-1:2013 (E) - **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C**. Switzerland, 2013. 9 p.

INATSU, Y. et al. Efficacy of Acidified Sodium Chlorite Treatments in Reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese Cabbage. **Journal of Food Protection**. V. 68, n. 2, p. 251-255, 2005. Disponível em: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-68.2.251> . Acesso em: 05 mai.2017.

ITIS (2018). “*Lactuca sativa* L”. **Integrated Taxonomic Information System**. Disponível em:

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=36607#null. Acesso em: 06 mai.2018.

JACKSON, C.R. et al. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with comercial salad leaf vegetables. **BMC Microbiology**.V.13, p. 274-286, 2013. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2180-13-274> . Acesso em: 21 set.2017.

JAY, J.M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D.A. **Modern food Microbiology**. 7th Ed. New York, Springer, 2005.

JUNEMANN, S. et al. Updating benchtop sequencing performance comparison. **Nature Biotechnology**. V. 31, n. 4, p. 294-296, 2013. Disponível em: <https://www-nature.ez74.periodicos.capes.gov.br/articles/nbt.2522.pdf> . Acesso em: 23 mai.2017.

KAUR, R.; MALIK, C. P. Next Generation Sequencing: A Revolution in Gene Sequencing. **CIBTech Journal of Biotechnology**. V.2, n.4, p. 1-20, 2013. Disponível em: <http://www.cibtech.org/J-Biotechnology/PUBLICATIONS/2013/Vol-2-No-4/CJB-01-01-%20MALIK-%20NEXT-%20SEQUENCING.pdf> . Acesso em: 12 ago.2017.

KUAYE, A. Y. **Limpeza e sanitização na indústria de alimentos**. 1° ed. Vol. 4, Rio de Janeiro/RJ. Atheneu: 2017.

LARGURA, A. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema automatizado biosseguro para tratamento, reciclagem e descarte de resíduo de microbiologia clínica**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

LEE, Y.S. et al. Effects of Chlorine Concentrations and Washing Conditions on the Reduction of Microbiological Contamination in Lettuce. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem**. V.52, n. 3, p. 270-274, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Sang-Do-Ha/publication/257917153_Effects_of_Chlorine_Concentrations_and_Washing_Conditions_on_the_Reduction_of_Microbiological_Contamination_in_Lettuce/links/53cf0d900cf2f7e53cf7e733/Effects-of-Chlorine-Concentrations-and-Washing-Conditions-on-the-Reduction-of-Microbiological-Contamination-in-Lettuce.pdf . Acesso em: 05 mai.2017.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F. et al. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. **Food Microbiology**. V. 27, p.199-204, 2010. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S074000200900207X> . Acesso em: 28 julh.2017.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F. et al. Effect of new sanitizing formations on quality of fresh-cut iceberg lettuce. **Postharvest Biology and Technology**. V. 85, n. 1, p. 102-108, 2013. Disponível em: https://ac-els-cdn.ez74.periodicos.capes.gov.br/S0925521413001476/1-s2.0-S0925521413001476-main.pdf?_tid=9aff6abe-2a6c-4b1f-9611-73c592d8fc2a&acdnat=1548035434_693adb6bb707aef8ef77b87e35e894bd . Acesso em: 12 Abr.2018.

LOMAN, N.J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature Biotechnology**. V.30, p. 434-439, 2012.

MAFFEI, D. F. et al. Assessing the effect of washing practices employed in Brazilian processing plants on the quality of ready-to-eat vegetables. **Food Science and Technology**. V. 69, p. 474-481, 2016. Disponível em: https://ac-els-cdn.ez74.periodicos.capes.gov.br/S0023643816300809/1-s2.0-S0023643816300809-main.pdf?_tid=58277fc1-0b3a-4f0c-8f3d-e3899a2068bf&acdnat=1548036020_e3e40a2d439a2974201d47b7a6071912 . Acesso em: 07 mai.2017.

MAYO, B. et al. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. **Current Genomics**. V. 15, 293–309, 2014.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**. V.34, 1597–1605, 2012.

MARIANO, A.M. S.E.; TEIXEIRA, A.N.S.; OKURA, M.H. Eficiência de desinfecção para o tratamento “minimamente processado” de alface cultivada em meio hidropônico. **FAZU em Revista**, Uberaba, n .2, p .68-78, 2005. Disponível em: <http://www.fazu.br/ojs/index.php/fazuemrevista/article/view/141/135> . Acesso em: 11 fev.2017.

MARIN, T. et al. Embalagem ativa para alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina. Vol. 31, n. 3, p. 653-660, 2010. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744097015.pdf>. Acesso em: 10, nov. 2018.

MASSAGUER, P. R. de. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo (SP): Varela, 2006. 258 p.

MELLO, J.C. et al. Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida-de-prateleira de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p. 418-426, 2003.

METZKER, M.L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**. V.11, n.1, p.31-46, 2010. Disponível em: <https://www-nature.ez74.periodicos.capes.gov.br/articles/nrg2626.pdf> . Acesso em: 21 fev. 2017.

MOREIRA, L. M. **Ciências Genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 p: il. Idioma: Português. ISBN 978-85-89265-22-5. Disponível em: <http://moreiralab.net/Livro/> . Acesso em: 20 abr. 2018.

MORETTI, C. L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p. Disponível em: <https://www.sisbin.ufop.br/novoportal/wp-content/uploads/2015/03/Manual-de-Processamento-Minimo-de-Frutas-e-Hortalicas.pdf> . Acesso em: 24 mai.2017.

NASCIMENTO, A.R. et al. Sanitização de saladas in natura oferecidas em restaurantes selfservice de São Luís-MA. **Higiene Alimentar**. V. 16, p. 63-67, 20023.

NASCIMENTO, K. O. et al. Alimentos minimamente processados: uma tendência de mercado. **Acta Tecnológica**. V. 9, n.1, p 48-61, 2014.

NCBI, 2018. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome .Acesso em 03.06.2018.

NIERMAN, W. C. et al. Genome data: what do we learn? **Current Opinion Structural Biology**. V. 10, p. 343-348, 2000. Disponível em: https://ac-els-cdn.ez74.periodicos.capes.gov.br/S0959440X00000944/1-s2.0-S0959440X00000944-main.pdf?_tid=b3f180bc-2873-448c-9a12-06d239d24207&acdnat=1548037972_8eb2b685ee90d7cf7a19f4a3d67c5282 . Acesso em: 27, fev.2017.

OLIVER, J.C.; GERMANO, J. L.; VEIGA, S.M.O.M. Eficiência de sanificantes alternativos sobre frutos contaminados artificialmente com *Escherichia coli*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**. V. 10, n.2, p. 351-359, 2012. Disponível em: <http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/719/pdf> . Acesso em: 28 jan. 2017.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **Food Science and Technology**. V. 42, p. 686–693, 2009. Disponível em: https://ac-els-cdn.ez74.periodicos.capes.gov.br/S0023643808001862/1-s2.0-S0023643808001862-main.pdf?_tid=2b1a6806-db5e-4515-95e5-687189b08913&acdnat=1548038358_20538517e24606ceed23ea70d70c3709 . Acesso em: 29 jan. 2017.

PAO, S. et al. Using Aqueous Chlorine Dioxide To Prevent Contamination of Tomatoes with *Salmonella enterica* and *Erwinia carotovora* during Fruit Washing. **Journal of Food Protection**. Vol. 70, n. 3, p. 629-634, 2007. Disponível em: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-70.3.629> . Acesso em: 26 jan.2017.

PARK, K. M. et al. Susceptibility of Foodborne Pathogens Isolated from Fresh-Cut Products and Organic Vegetable to Organic Acids and Sanitizers. **Journal of Food Hygiene and Safety**. Vol. 28, n. 3, p. 227-233, 2013. Disponível em: <http://koreascience.or.kr/article/JAKO201330251812691.page> . Acesso em: 23 mai. 2017.

POSADA-IZQUIERDO, G. D. et al. Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: Chlorine washing and modified atmosphere packaging. **Food Microbiology**. V.33, p. 131-138, 2013.

POSSAMAI, A. **Processamento de vegetais minimamente processados: Uma abordagem sobre higienização e os sanitizantes nela utilizados**. Monografia (Graduação). Engenharia de Alimentos, Universidade do Rio Grande do Sul – UFRGS - Porto Alegre, 2014. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/116233/000964530.pdf?sequence=1> . Acesso em: 21 jun.2017.

PRATAS, M. J. C. **Dióxido de cloro como biocida**. Dissertação (Mestrado) Ciências Farmacêuticas, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Almada, Portugal, 2014. Disponível em:

<https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/13068/1/Pratas%2c%20Mara%20Joaquina%20de%20Carvalho.pdf> . Acesso em: 13 fev.2017.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 369-394, 2003.

RASTOGI, G. et al. Leaf microbiota in an agroecosystem: Spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. **The ISME Journal**. V. 6, p. 1812–1822. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC3446804/pdf/ismej201232a.pdf> . Acesso em: 16 Mai. 2018.

ROSSI, E.M. et al. Biosurfactant Produced by *Salmonella* Enteritidis SE86 Can Increase Adherence and Resistance to Sanitizer on Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L., *cichoraceae*). **Frontiers in Microbiology**. V. 7, n. 9, p. 1-9, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4722381/pdf/fmicb-07-00009.pdf> . Acesso em 01 fev.2017.

RUSTAM, S. et al. Enterobacteriaceae: Etiological agentes of diarrhea. **Journal of Medical Sciences**. V. 6, p.149-154. 2006. Disponível em: <https://scialert.net/abstract/?doi=jms.2006.149.154> . Acesso em:16 Mai, 2018.

SALOMÃO, B.C.M. et al. Aplicação de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético para redução de esporos de *Penicillium expansum*, *Byssoschlamys fulva* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* na superfície de maçãs e em soluções aquosas. **Alimento e Nutrição**., Araraquara v. 22, n. 2, p. 219-230, 2011.

SANTANA, L. R. R. et al. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.264-269, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/2907/1/30171.pdf> . Acesso em: 14 abr.2017.

SANT'ANA, A.S. et al. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**. V.157, p. 52-58, 2012. Disponível em: https://ac-els-cdn.ez74.periodicos.capes.gov.br/S0168160512001985/1-s2.0-S0168160512001985-main.pdf?_tid=f6b5310f-f1d7-417d-8f14-34e7f3346910&acdnat=1548041011_dc0d8f2eb04be07aa7793ff737192ae4 . Acesso em: 03 fev.2017.

SANTOS, H. D. S. et al. Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, p. 56-60, 2012.

SARAVANAKUMARI, P; MANI, K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. **Bioresource Technology**. V.101, p. 8851-8854, 2010.

SELMA, M. V. et al. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. **Food Microbiology**. V. 25, p. 162-168, 2008.

SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. 5° ed. São Paulo, Ed. Varela, 2002, 479 p.

SILVEIRA, J. B.; HESSEL, C.T.; TONDO, E. C. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis on lettuces used by minimally processed vegetable industries. **The Journal of Infection in Developing Countries**. V.11, n. 1, p.34-41, 2017. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/28141588/1644> . Acesso em: 02 mai.2018.

SINGH, N. et al. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of diferente sanitizers against *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce. **Food Microbiol**. V.19, p. 83–193, 2002. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.524.877&rep=rep1&type=pdf> . Acesso em: 22 fev.2017.

SOLIERI, L.; DAKAL, T. C.; GIUDICI, p. Next-generation sequencing and its potential impact on food microbial genomics. **Ann Microbiol**. V. 63, p.21–37, 2013. Disponível em: [https://link.springer-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs13213-012-0478-8.pdf](https://link.springer.com.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs13213-012-0478-8.pdf) . Acesso em: 07 Jun.2018.

TOLEDO, A. C. T. **Estudo de tratamento químico de urina para redução no consumo de água em descargas residenciais**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, Universidade de São Paulo, 2013.

TOMÁS-CALLEJAS, F. et al. Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* cross-contamination on fresh-cut Red Chard. **Food Control**. V.23, n. 2, p.325-332, 2012.

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.

UKUKU, D.O. et al. Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. **International Journal of Food Microbiology**. V.104, n. 2, p. 225-233, 2005.

VANDAMM, J. P. et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. **Food Microbiology**. V. 34, n. 1, p. 151 -157, 2013.

VANETTI, M.C.D.; PUSCHMANN, R.; FANTUZZI, E. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, V. 24, n. 2, p. 207-211,2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v24n2/v24n2a08.pdf> . Acesso em: 09 Mai.2018.

VAN HAUTE, S. et al. Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 79, n. 9, p. 2850–2861, 2013. Disponível em: <<https://aem.asm.org/content/aem/79/9/2850.full.pdf>>. Acesso em: 17 Jun. 2018.

WAGHMARE, R. B.; ANNAPURE, U. S. Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 3, p. 62-69, 2015..

WANG, Y.; QIAN P-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**. V. 4, n. 10, p. 1-9, 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0007401&type=printable> .Acesso em : 20 set.2018.

WATADA, A. E.; NATHANEE, P. K.; MINOTT, D.'A. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. **Postharvest Biology and Technology**. V.9, p. 115-125, 1996.

- WILLIAMS, T.R. et al. Season, irrigation, leaf age, and *Escherichia coli* inoculation influence the bacterial diversity in the lettuce phyllosphere. **PLoS ONE**. V.8, n. 7, p. 1-14, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0068642&type=printable> . Acesso em: 10 Fev.2018.
- ZHAN, I. et al. Browning inhibition and quality preservation of fresh-cut romaine lettuce exposed to high intensity light. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. V. 14, p.70-76, 2012.
- ZHANG, S.; FARBER, J.M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**. V.13, n. 4, p. 311-321, 1996.
- ZWIELEHNER, J. et al. DGGE and real-time PCR analysis of lactic acid bacteria in bacterial communities of the phyllosphere of lettuce. **Mol Nutr Food Res**. V. 52, p. 614–623, 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mnfr.200700158> . Acesso em: 05 set.2018.