UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
THAÍS FERNANDES JUSTO

Salmonella spp. EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.) ORGÂNICA: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA UTILIZANDO-SE MOLECULAR DETECTION SYSTEM (MDS-3M) E SENSIBILIDADE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO E AO ÁCIDO CÍTRICO

RIO DE JANEIRO
2018

Thaís Fernandes Justo

Salmonella spp. EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.) ORGÂNICA: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA UTILIZANDO-SE “MOLECULAR DETECTION SYSTEM (MDS-3M) E SENSIBILIDADE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO E AO ÁCIDO CÍTRICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores:
Prof.ª Karen Signori Pereira, D.Sc.
Prof.º Eduardo César Tondo, D.Sc.

Rio de Janeiro
2018

Justo, Thaís Fernandes
J96s Salmonella spp. em alface orgânica: Avaliação da prevalência utilizando Molecular Detection System e sensibilidade ao hipoclorito de sódio e ao ácido cítrico / Thaís Fernandes Justo. -- Rio de Janeiro, 2018.
61 f.

Orientadora: Karen Signori Pereira.
Coorientadora: Eduardo César Tondo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. Salmonella. 2. Alimentos orgânicos. 3. Minimamente processados. 4. Água de lavagem. 5. Sanitizante. I. Pereira, Karen Signori, orient. II. Tondo, Eduardo César, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado, principalmente, resiliência. Ter fé me ajudou a terminar o mestrado tão sonhado com mais tranquilidade e amor.

Agradeço aos meus pais, que sempre lutaram para que minha educação fosse a melhor possível e me apoiaram na escolha de seguir o mestrado acadêmico. Agradeço por todos os abraços que me deram, por todo carinho e palavras de incentivo. Tê-los na minha vida faz eu me sentir mais completa.

Agradeço ao meu noivo por todo amor a mim dedicado. Tê-lo em minha vida foi essencial nessa trajetória. Agradeço por me apoiar nas minhas decisões, me incentivar a trilhar esse caminho e a ir além. O nosso amor é um combustível em minha vida e saber que passaremos a vida inteira juntos me traz a plenitude.

Agradeço aos meus familiares, principalmente ao meu irmão Thiago e cunhada Amanda, pelo incentivo e, principalmente, pelo presente que me deram, a minha afilhada Helena.

Agradeço a minha orientadora e grande amiga Karen, por ter sido mais que uma orientadora: uma amiga que me ajudou a me encontrar na vida acadêmica, me deu oportunidade de aprender um pouco do que sabe. Cada café que tomamos juntas foi uma terapia. Obrigada por estar ao meu lado sempre que preciso.

Agradeço, também, ao meu orientador Eduardo Tondo, por ter aceitado compartilhar seus conhecimentos comigo e ter ajudado muito para que esse trabalho fosse feito da melhor forma. Agradeço por toda ideia, toda correção, todo carinho que teve por esse trabalho e por mim. Já admirava muito seu trabalho antes de conhecê-lo. Tê-lo me orientando foi uma experiência maravilhosa.

Agradeço aos meus amigos do MicrAlim, que fizeram meus dias no laboratório serem ainda mais divertidos. João, Camilla, Verônica, Marselle, Letícia e Dani, obrigada pelo carinho e parceria no laboratório.

Agradeço aos meus amigos da UFRJ que me incentivaram a seguir o mestrado: Douglas, Fernanda, Julio, Marcello, Meire, Nelson, Sabrina e Victor. Eles, com certeza, fizeram meus dias, tanto na graduação quanto no mestrado, mais felizes.

Agradeço, ainda, aos professores e funcionários da UFRJ que me incentivaram demais no mestrado, em especial professores Armando, Carlos André,

Érika, Ivaldo e Lauro e funcionários Fábio, Geraldo, Marcus e Marquinhos, seja com palavras de carinho ou de incentivo, além da preocupação com a minha vida pessoal. A gratidão que tenho por eles é enorme.

“Quanto mais eu estudo a natureza, mais eu fico maravilhado com as obras do Criador. A ciência me aproxima de Deus.”

Louis Pasteur

RESUMO

JUSTO, Thaís Fernandes. ***Salmonella* spp. em alface (*Lactuca sativa* L.) orgânica: avaliação da prevalência utilizando-se "Molecular Detection System (MDS-3M) e sensibilidade ao hipoclorito de sódio e ao ácido cítrico.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O consumo de alimentos frescos tem aumentado com a busca por produtos mais saudáveis. Além disso, há, também, aumento na procura por alimentos de origem vegetal e livre de defensivos agrícolas, como os alimentos orgânicos, por exemplo. Esse tipo de sistema de cultivo utiliza esterco como fertilizante, o que pressupõe uma maior contaminação microbiana de origem entérica. Na indústria de minimamente processados, a lavagem e desinfecção são as únicas etapas que visam reduzir e/ou eliminar micro-organismos patogênicos como *Salmonella* spp. A água utilizada para a lavagem e desinfecção desses produtos pode ser uma fonte de contaminação cruzada quando diferentes lotes de vegetais são processados no mesmo tanque de lavagem. Por ser a alface a hortaliça folhosa mais consumida pela população brasileira, esse trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. em alfaces orgânicas coletadas em feiras de alimentos orgânicos do Rio de Janeiro, bem como avaliar a sensibilidade dos isolados ao hipoclorito de sódio (25 ppm e 50 ppm) e ácido cítrico (0,5% e 1%) em água de lavagem. Foram coletadas 150 amostras de alfaces orgânicas, crespas e lisas, e a análise de *Salmonella* spp. foi realizada por biologia molecular, utilizando-se o MDS-3M (*Molecular Detection System*). Os testes de sensibilidade de *Salmonella* aos sanitizantes foram realizados em água de lavagem e uma contagem do micro-organismo foi realizada após os tempos de contato de um, dois, três, quatro, cinco, 10 e 15 minutos. Como resultado, *Salmonella* spp. foi detectada em uma amostra de alface orgânica, o que corresponde a uma prevalência de 0,67%. No teste de sensibilidade, o hipoclorito de sódio a 50 ppm e a 25 ppm foram capazes de reduzir 6 log UFC/mL de *Salmonella* em um e três minutos de contato, respectivamente, enquanto o ácido cítrico a 0,5% e 1% foram capazes de reduzir 1,26 log UFC/mL e 1,74 log UFC/mL, respectivamente, ao final de 15 minutos. O hipoclorito de sódio demonstrou maior capacidade de redução microbiana em água de lavagem, indicando ser mais apropriado para evitar a contaminação cruzada entre lotes de alface higienizados no mesmo tanque.

Palavras-chave: *Salmonella*. Alimentos orgânicos. Minimamente processados. Água de lavagem. Sanitizante.

ABSTRACT

JUSTO, Thaís Fernandes. **Salmonella spp. in lettuce (Lactuca sativa L.) organic: evaluation of the prevalence using "Molecular Detection System (MDS-3M) and sensitivity to sodium hypochlorite and citric acid.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertation (Master's degree in Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The consumption of fresh food has increased with the search for healthier products. In addition, there is also an increase in demand for food of plant origin and products without pesticides, such as organic food, for example. This type of cultivation system uses manure as fertilizer, which presupposes a greater microbial contamination of enteric origin. In the minimally processed industry, washing and disinfection are the only steps to reduce and/or eliminate pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp. Water used for washing and disinfecting products can be a source of cross-contamination when differents batches of vegetables are processed in the same tank. Because the lettuce is the vegetable most consumed by the Brazilian population, this study aimed to evaluate the prevalence of *Salmonella* spp. in organic lettuce collected at organic food fairs in Rio de Janeiro, as well as to evaluate the sensitivity of the isolates to sodium hypochlorite (25 ppm and 50 ppm) and citric acid (0.5% and 1%) in washing water were evaluated. 150 samples of organic lettuce were collected, crisp and smooth, and *Salmonella* spp. was performed by molecular biology, using the MDS-3M (Molecular Detection System). *Salmonella* sensitivity tests on the sanitizers were performed in wash water and a count of the microorganism was performed after the contact times of one, two, three, four, five, 10 and 15 minutes. As a result, *Salmonella* spp. was detected in a sample of organic lettuce, corresponding to a prevalence of 0.67%. In the sensitivity test, 50 ppm and 25 ppm sodium hypochlorite were able to reduce 6 log CFU/mL of *Salmonella* in one and three minutes of contact, respectively, while 0.5% and 1% citric acid were able to reduce 1.26 log CFU/mL and 1.74 log CFU/mL, respectively, after 15 minutes. Sodium hypochlorite demonstrated greater microbial reduction in wash water, indicating that it was more appropriate to avoid cross contamination between lots of hygienic lettuce in wash tanks.

Keywords: *Salmonella*. Organic food. Minimally processed. Wash water. Sanitizer.

Sumário

1. Introdução 10
2. Objetivos 11
2.1. Objetivo Geral 11
2.2. Objetivos Específicos 11
3. Revisão bibliográfica 12
3.1. Alface (*Lactuca sativa* L.) 12
3.2. Alimentos orgânicos 15
3.3.Contaminação de vegetais e a indústria de minimamente processados 19
3.4. *Salmonella* spp. 24
4. Resultados 29
4.1. Artigo 1 30
4.2. Artigo 2 38
5. Discussão Geral 51
6. Conclusão 53
Referências 54

1. Introdução

Na cadeia de produção de produtos frescos minimamente processados, a lavagem e desinfecção com soluções sanitizantes são os únicos passos para a redução de micro-organismos patogênicos e, por isso, são etapas importantes nesse processo. O uso dessas soluções nas águas de lavagem dos tanques objetiva, principalmente, controlar a contaminação cruzada entre os lotes de vegetais processados.

Os sanitizantes clorados são os mais utilizados pela indústria de vegetais minimamente processados por terem um ótimo poder germicida, serem econômicos e de fácil utilização, sendo o hipoclorito de sódio o mais comum. Porém, alternativas para a substituição de compostos clorados tem sido estudadas, como por exemplo o uso de ácidos orgânicos que, em concentrações maiores do que as já utilizadas pelas indústrias para aumentar o *shelf-life* de produtos, pode inativar as células bacterianas.

Salmonella é um gênero bacteriano que comumente causa doenças de origem alimentar. Há uma estimativa de que mais de um milhão de pessoas são acometidas por salmonelose por ano nos Estados Unidos da América e, apesar de os produtos de origem animal serem os veículos mais comuns desse micro-organismo, há relatos de sua presença em vegetais destinados ao consumo in natura.

Avanços tecnológicos tornaram a detecção de micro-organismos patogênicos importantes, como *Salmonella*, mais rápida e com maior sensibilidade, especificidade, eficiência de custo e mão-de-obra, reduzindo erros humanos e custos, além de permitir um maior número de ensaios em um determinado tempo. Um exemplo é o método *Molecular Detection System* (MDS-3M), da 3M Food Safety, que, baseado na técnica *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification* (LAMP), consegue identificar o micro-organismo alvo através da amplificação isotérmica de ácido desoxirribonucleico (DNA) com detecção por bioluminescência.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. em alfaces orgânicas, de forma a poder contribuir futuramente em análises de risco de indústrias de minimamente processados, bem como avaliar a redução de *Salmonella* spp. em água de lavagem com hipoclorito de sódio e com ácido cítrico em diferentes concentrações e tempos de exposição.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. em alfaces orgânicas coletadas em feiras de alimentos orgânicos do município Rio de Janeiro – RJ/Brasil, bem como avaliar a redução desse micro-organismo em água de lavagem com hipoclorito de sódio e com ácido cítrico, em diferentes concentrações e tempos de exposição.

2.2. Objetivos Específicos

- Utilizar o *Molecular Detection System* (MDS-3M) para avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. em alfaces orgânicas coletadas em feiras de alimentos orgânicos do município Rio de Janeiro;
- Avaliar a sensibilidade de *Salmonella* isolada de alface orgânica ao hipoclorito de sódio nas concentrações de 25 ppm e 50 ppm em água de lavagem nos tempos de exposição de um, dois, três, quatro, cinco, 10 e 15 minutos;
- Avaliar a sensibilidade de *Salmonella* isolada de alface orgânica ao ácido cítrico nas concentrações de 0,5% e 1% em água de lavagem nos tempos de exposição de um, dois, três, quatro, cinco, 10 e 15 minutos.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Alface (*Lactuca sativa* L.)

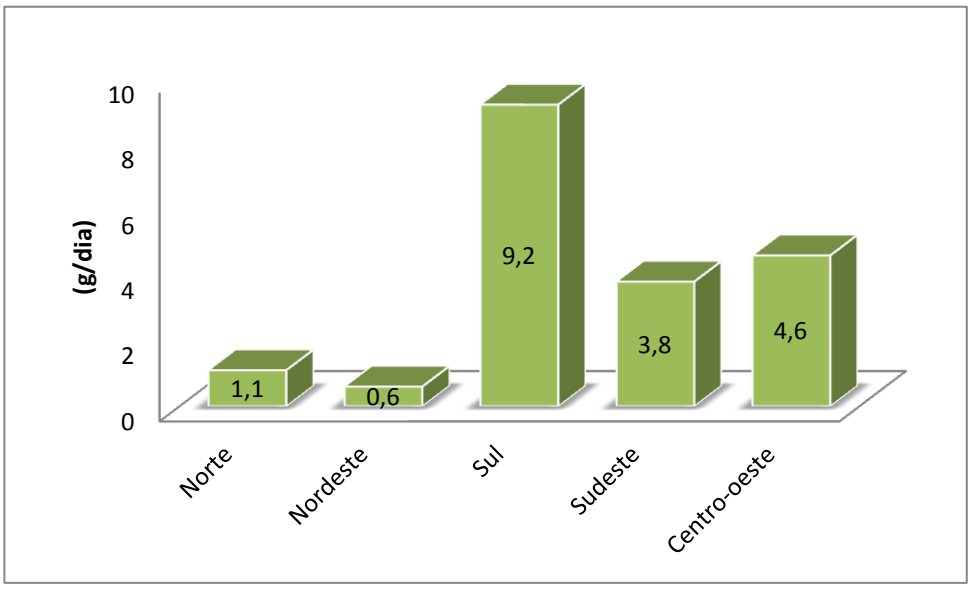
Originária da Ásia, a alface (*Lactuca sativa* L.), hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, foi trazida pelos portugueses no século XVI durante a colonização do Brasil. A introdução de várias espécies de hortaliças foi essencial para servir não só como alimentação para os colonizadores, mas, também, como material para melhoramento genético de forma que essas hortaliças se adaptassem às diferentes condições climáticas no Brasil (Madeira et al., 2008).

Pertencente à família Asteraceae, a alface é uma planta herbácea, anual, que se adapta melhor em solos com boa capacidade de retenção de água. Seu crescimento é lento inicialmente e, depois de 30 dias, tem um aumento de ganho de massa acentuado até a colheita (Yuri et al., 2016).

O ministério da saúde, em seu Guia Alimentar, recomenda o consumo de alimentos saudáveis, principalmente os frescos, optando por refeições caseiras em detrimento de *fast foods* (Brasil, 2014). Além disso, recomenda o consumo diário de três porções de legumes e verduras nas refeições. O consumo mínimo recomendado desses tipos de alimentos e de frutas é de 400g/dia, significando um aumento de três vezes em relação ao consumido atualmente pela população brasileira (Brasil, 2008)

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), a região com maior consumo alimentar médio de alface *per capita* no Brasil entre 2008 e 2009 foi o Sul do país, com 9,2g/dia, conforme mostra a Figura 1.

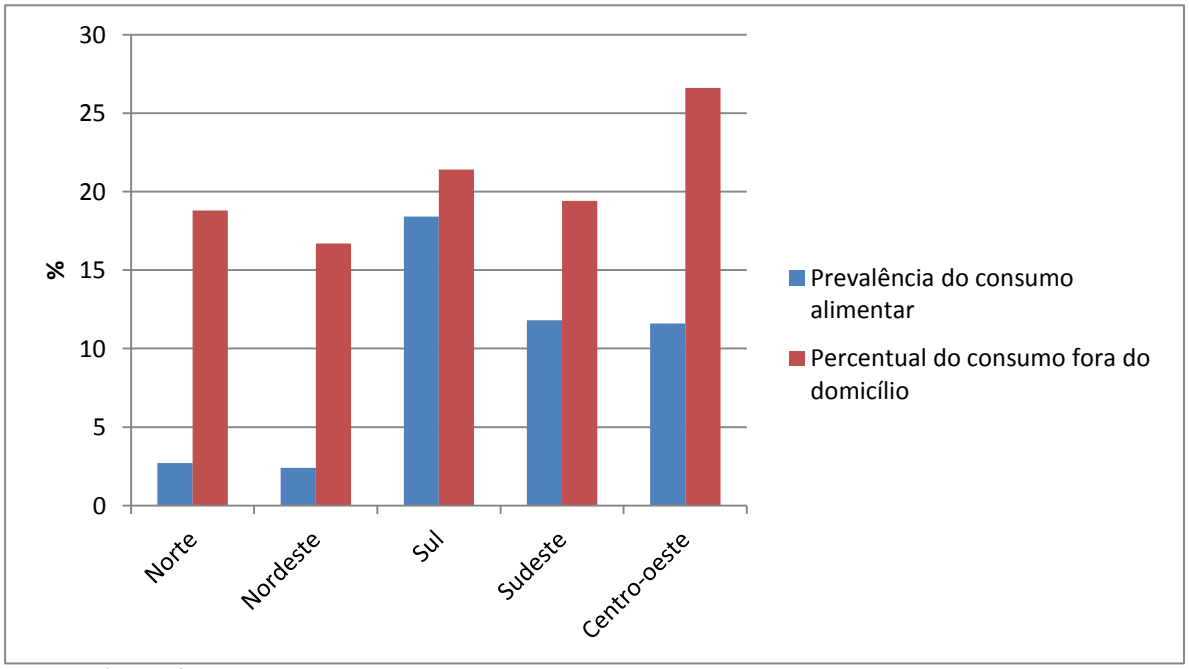
Figura 1 – Consumo alimentar médio de alface *per capita* por grandes regiões do Brasil no período de 2008-2009.



Fonte: adaptado IBGE, 2011.

Ainda segundo o IBGE, no mesmo período, a região com o maior percentual de prevalência do consumo de alface no Brasil foi a região Sul. Porém a região Centro-Oeste foi a que obteve maior prevalência do consumo da hortaliça fora do domicílio, como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Alface: Prevalência de consumo alimentar pela população e percentual do consumo fora do domicílio, por grandes regiões, no período 2008-2009.



Fonte: adaptado IBGE, 2011.

Os dados do IBGE também mostram que o consumo *per capita* no Brasil é maior entre os adultos e idosos, sendo os adultos os maiores consumidores de alface fora do domicílio, como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 – Consumo alimentar médio de alface per capita e percentual do consumo fora do domicílio em relação ao total consumido dos adolescentes, adultos e idosos no período 2008-2009.

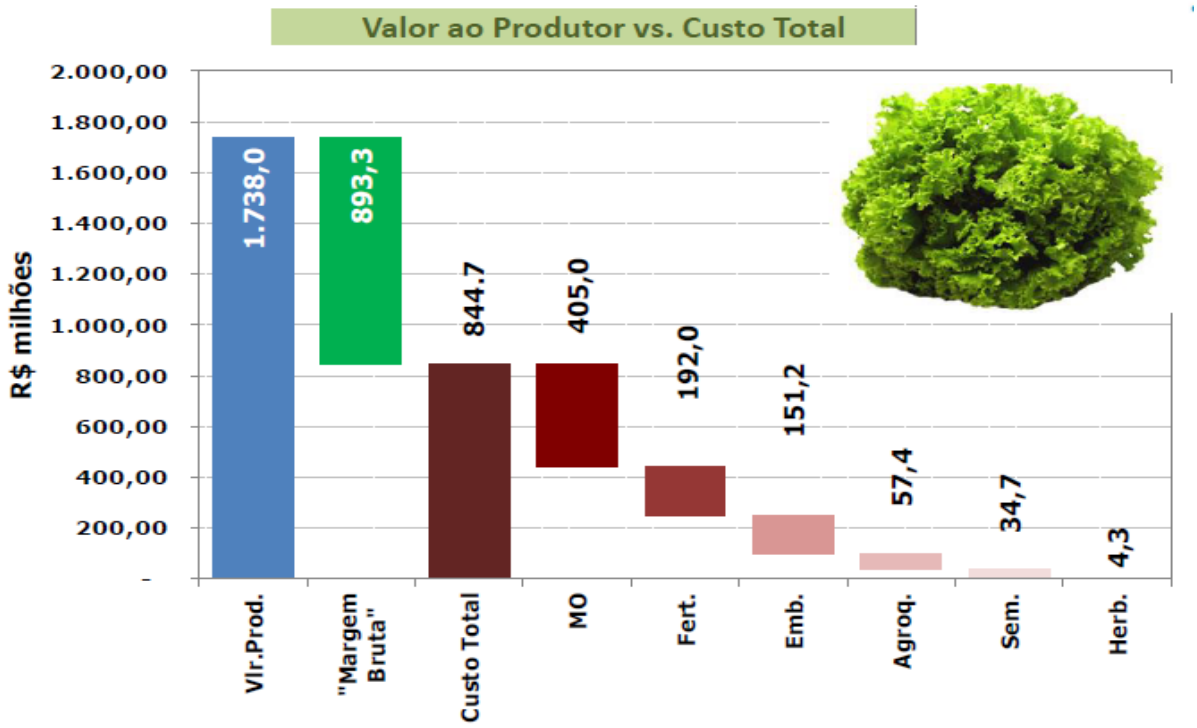
Consumido por:	Consumo *per capita* (g/dia)	Percentual do consumo fora do domicílio (%)
Adolescente	2,1	6,9
Adulto	4,0	25,9
Idoso	3,9	4,4

Fonte: adaptado IBGE, 2011.

Segundo dados da Associação Brasileira de Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2014), referentes ao ano base de 2012, a produção de alface no Brasil foi de 1,6 milhões de toneladas, sendo a terceira hortaliça de maior volume de produção, ficando atrás somente do tomate e da melancia.

A Figura 3 mostra o valor da produção, deste mesmo ano, ao produtor *versus* o custo total da produção (incluindo mão de obra, fertilizantes, embalagens, agroquímicos, sementes e hebicidas).

Figura 3 – Valor ao produtor vs. Custo total da produção de alface no ano base de 2012.



Fonte: ABCSEM, 2014.

A Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro (EMATER), no Acompanhamento Sistemático da Produção Agrícola em dados de 2015, registrou 2877 produtores de alface no estado, uma produção de 134 mil toneladas em uma área total de 5298,2ha e faturamento de R$162.774.770,10. O município de Teresópolis é o maior produtor do Rio de Janeiro, tendo 2000 produtores produzindo em uma área de 4825 ha com produção de 124 mil toneladas (EMATER, 2015).

3.2. Alimentos orgânicos

Um alimento orgânico é aquele que provém de princípios básicos que preservam a qualidade e fertilidade do solo, utilizando matéria orgânica nas plantações no lugar de adubos artificiais (Brasil, 2003). Internacionalmente, a agricultura orgânica é regulamentada pelas diretrizes do *Codex Alimentarius* e pela *International Federation of Organic Agriculture Movements* (IFOAM), a qual estabelece quatro princípios para este tipo de agricultura: saúde, ecologia, equidade e cuidado (IFOAM, 2017).

No Brasil, para ser considerado um produtor orgânico, é necessária uma certificação e um selo de garantia de produto orgânico. Para obtê-los, deve-se cumprir todos os requisitos legais da Lei Federal 10.831 de 23 de dezembro de 2003 que diz:

> Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável.

Ainda segundo a Lei Federal 10.831 de 23 de dezembro de 2003, o sistema orgânico deve priorizar métodos culturais, biológicos e renováveis em detrimento de materiais sintéticos e eliminar o uso de organismos geneticamente modificados (OGM) e radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção, de forma que se tenham produtos mais saudáveis, isentos de substâncias que possam fazer mal à saúde, além de promover ações que possam ser boas ao meio ambiente (Brasil, 2003).

O decreto nº 6323, de 27 de dezembro de 2007 regulamenta a lei anteriormente citada, definindo as diretrizes da produção, comercialização,

informação da qualidade e insumos da agricultura orgânica, bem como os mecanismos de controle, fiscalização e penalidades aplicáveis (Brasil, 2007).

Além da Lei nº 10.831/03 e do decreto nº 6.323/07, estão entre as regulamentações a serem consultadas quando se quer certificar o produto orgânico as seguintes Instruções Normativas (IN) do MAPA:

- IN Nº 17/09 - extrativismo sustentável orgânico (Brasil, 2009b);
- IN Nº 18/09, alterada pela IN 24/11 – processamento (Brasil, 2009c; 2011a);
- IN Nº 19/09 - mecanismos de controle e formas de organização (Brasil, 2009d);
- IN Nº 50/09 - selo federal do SisOrg (Brasil, 2009a);
- IN Nº 28/11 - produção de organismos aquáticos (Brasil, 2011b);
- IN Nº 37/11 - cogumelos comestíveis (Brasil, 2011c);
- IN Nº 38/11 - sementes e mudas orgânicas (Brasil, 2011d);
- IN Nº 46/11 - produção vegetal e animal (Brasil, 2011e).

Desta forma, para um produtor certificar que o seu produto é orgânico, é necessário atender às normas vigentes. A certificação pode ser feita por auditoria, por sistema participativo de garantia ou pelo controle social na venda direta. No caso de ser uma agricultura familiar, a certificação é dispensável, exigindo-se somente o credenciamento em uma organização de controle social cadastrada pelo órgão fiscalizador oficial (IPD, 2011).

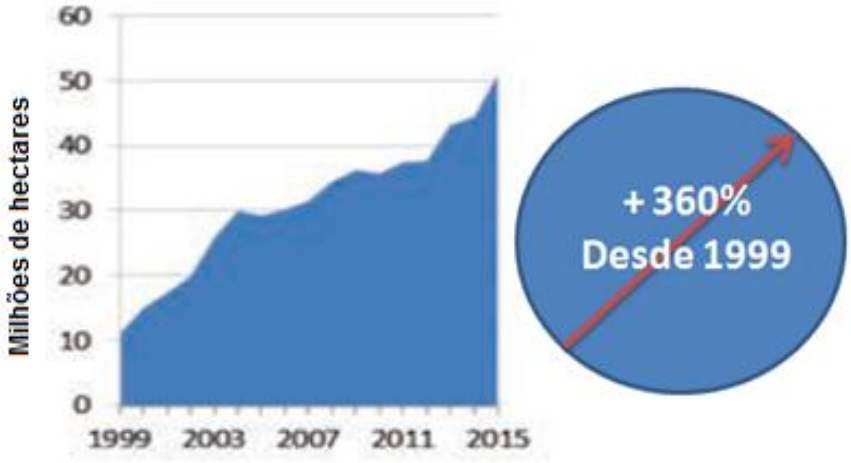
Sendo assim, os produtos certificados receberão um selo único oficial do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica (Figura 4), tendo os requisitos para a sua utilização regulamentados pela Instrução Normativa nº 50, de 5 de novembro de 2009. É importante ressaltar que somente poderão utilizar o selo os produtos orgânicos de unidades de produção controlados por organismos credenciados no MAPA (Brasil, 2009a).

Figura 4 - Selo Federal do SisOrg

Fonte: Brasil, 2009a

Segundo o relatório *The World Organic Agriculture* de 2017, elaborado pela *International Federation of Organic Agriculture Movements* (IFOAM) e pelo *Research Institute of Organic Agriculture* (FIBL), a área destinada à agricultura orgânica tem crescido conforme mostra a Figura 5, havido um aumento de 6,5 milhões de hectares de 2014 para 2015.

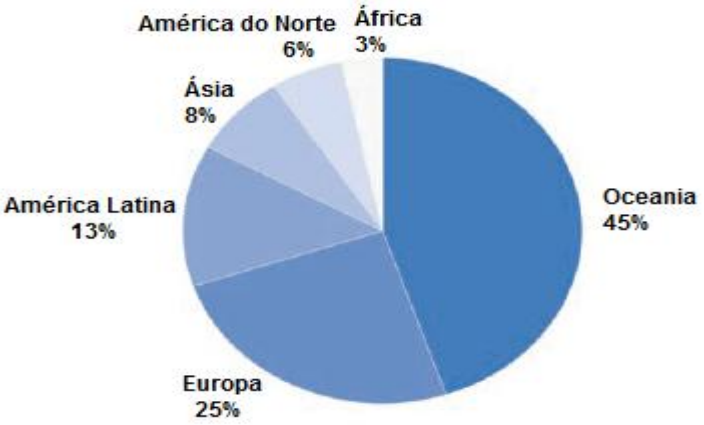
Figura 5 – Crescimento da área destinada a agricultura orgânica de 1999 a 2015.



Fonte: adaptado Willer; Lernoud, 2017.

Os dados tabulados de 2015 mostram que 50,9 milhões de hectares são destinados a produção orgânica em todo o mundo, sendo a Oceania a região com maior área destinada a este sistema de cultivo, com 45% do total (Willer; Lernoud, 2017), como mostra a Figura 6.

Figura 6 – Distribuição da área destinada à agricultura orgânica por região em 2015.



Fonte: adaptado Willer; Lernoud, 2017.

Ainda segundo o relatório *The World Organic Agriculture* de 2017, a Austrália é o país com maior área destinada ao cultivo orgânico, com 22 milhões de hectares. Já o Brasil se encontra na 12º posição, com 750 mil hectares. Porém a produção orgânica corresponde somente a 0,3% do total da produção agrícola no país (IFOAM, 2017).

As principais diferenças entre a agricultura convencional e a orgânica são mostradas no Quadro 2.

Quadro 2 – Diferenças entre a agricultura convencional e orgânica

CONVENCIONAL	ORGÂNICA
Uso adubos químicos e agrotóxicos.	Uso de adubos orgânicos (composto, esterco, adubo verde) e controle alternativo de pragas e doenças
Monocultura, aliada a exigência de grandes escalas de produção.	Produção mais diversificada, aumento da biodiversidade
Criação de espécies de pragas e doenças resistentes e a eliminação de seus inimigos naturais.	Manejo ecológico das pragas e doenças
Degradação do solo e a contaminação de cursos d'água por práticas equivocadas: monocultura, uso intensivo de máquinas e implementos agrícolas, baixa cobertura do solo, entre outras.	Uso de práticas conservacionistas do solo e preservação ambiental
Alta dependência externa de insumos e de energia não renovável.	Busca a autosustentabilidade dos sistemas de produção
Contaminação de trabalhadores rurais e consumidores por usos indevidos de agrotóxicos e aditivos químicos.	Produção de alimentos livres de contaminação por agrotóxicos: mais saúde para o trabalhador rural e para o consumidor

Fonte: adaptado de Brasil, 2009e.

Turra et al. (2015), em uma revisão de artigos sobre o perfil do consumidor brasileiro de alimentos orgânicos, perceberam que o consumo desse tipo de alimento está diretamente relacionado à busca por alimentos mais saudáveis, principalmente por serem livres de agroquímicos. A maioria dos consumidores no Brasil é do sexo feminino, com mais de 30 anos, com nível superior (Turra et al., 2015). Silva et al. (2013) traçaram o perfil dos consumidores na cidade do Rio de Janeiro/RJ e obtiveram as mesmas percepções, além de que os mesmos tem, em sua maioria, uma renda familiar de mais de 10 salários mínimos.

3.3. Contaminação de vegetais e a indústria de minimamente processados

A microbiota dos vegetais produzidos na terra é, em geral, a mesma que a do solo (Jay, 2005, p. 151). O Quadro 3 mostra as bactérias comuns em alimentos, que podem vir dos solos, por exemplo, bem como as que aderem às plantas, se tornando parte da microbiota dos alimentos frescos.

Quadro 3 – Importância relativa de oito fontes de bactérias em alimentos

Bactérias	Solo e água	Plantas e derivados	Utensílios de alimentos	Trato gastro-intestinal	Manipula-dores de alimentos	Rações animais	Animais	Ar e pó
Bacillus	xx	x	x		x	x	x	xx
Campylobacter				xx	x			
Clostridium	xx	x	x	x	x	x	x	xx
Enterobacter	x	xx	x				x	
Enterococcus	x	x	x	xx	x	x	x	x
Escherichia	x	x		x	x			
Listeria	x	xx		x	x	x	x	
Salmonella				xx			xx	
Shigella				xx				
Staphylococcus				x	xx		x	
Vibrio	xx			x				
Yersinia	x	x		x				

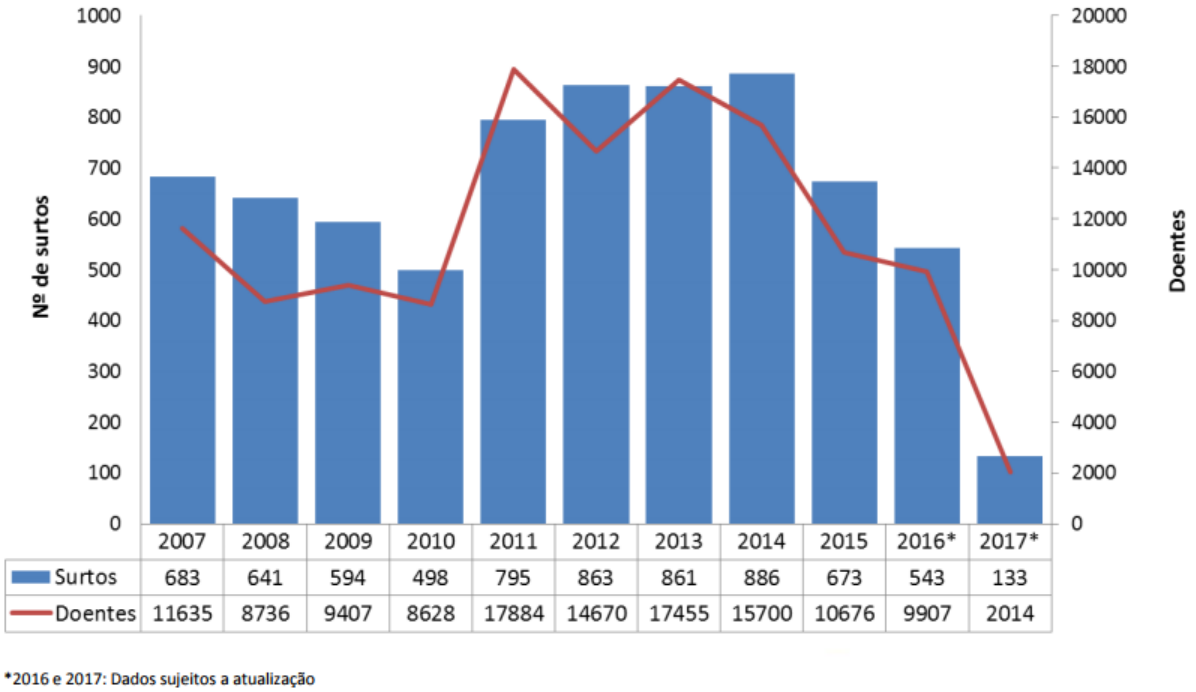
Nota: XX indica uma fonte muito importante.
Fonte: adaptado de Jay, 2005.

As doenças veiculadas por alimentos (DVA) são doenças adquiridas após a ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos e/ou toxinas produzidas por eles. Porém, sabe-se que, por alguns patógenos causarem sintomas brandos,

um número reduzido de casos é notificado às agências de saúde, seja porque algumas pessoas não procuram avaliação médica, seja porque, quando procuram, os médicos não notificam o caso. Há ainda os casos que a enfermidade é assintomática (Forsythe, 2013, p. 39).

Scalan et al. (2011) fizeram uma estimativa de que, por ano, 31 patógenos causem 37,2 milhões de doenças, sendo 9,4 milhões veiculadas por alimentos nos Estados Unidos. Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2017), houve um elevado número de doentes e surtos ocasionados por DVA entre 2007 e 2017 no Brasil, como mostra a Figura 7.

Figura 7 – Série histórica de surtos e doentes por DVA no Brasil entre 2007 e 2017.

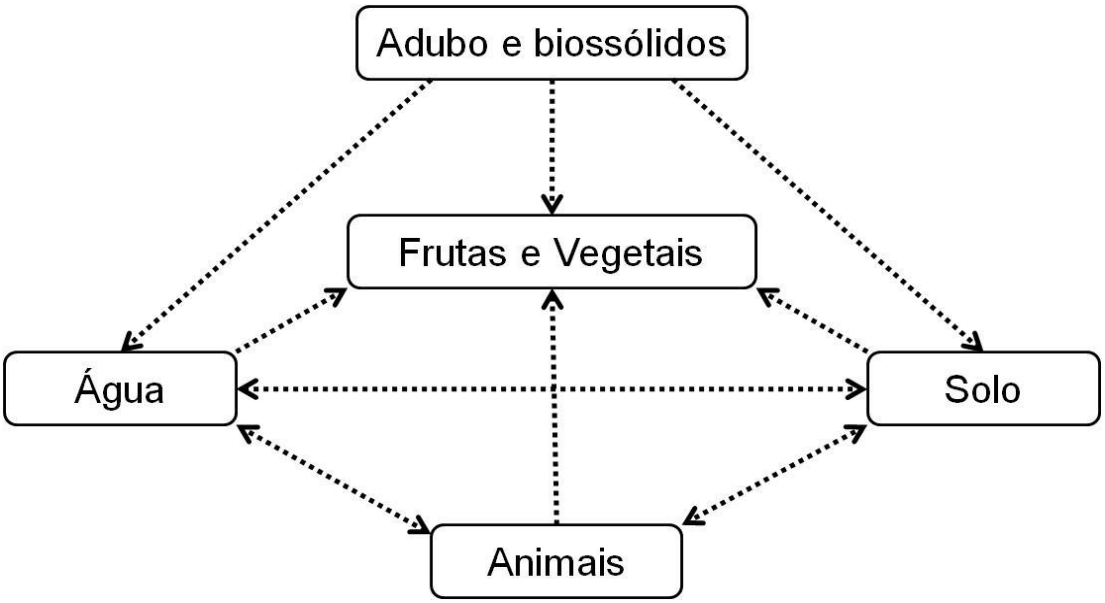


Fonte: Brasil, 2017.

A *Food and Agriculture Organization* (FAO), em seu relatório sobre surtos ocasionados por DVA em 2008 mostrou várias doenças pelo consumo de folhas verdes (WHO, 2008). As hortaliças, além das frutas, são veículos de muitos agentes etiológicos de enfermidades entéricas, sendo a contaminação fecal o fator de maior relevância (Rodrigues et al., 2014). Franz et al. (2005) mostraram que *Salmonella enterica* Typhimurium e *E. coli* O157:H7 podem sobreviver por longos períodos (até meses) tanto no esterco quanto em solos tratados com o mesmo. Porém os micro-organismos podem ser veiculados, também, por águas de esgotos domésticos e

córregos contaminados, estocagem inadequada em caixas não higienizadas ou juntamente com produtos vegetais já deteriorados (Rodrigues et al., 2014). A Figura 8 mostra as principais fontes e rotas de contaminação de frutas e vegetais.

Figura 8 – Principais fontes e rotas de contaminação de frutas e vegetais.



Fonte: adaptado de Maffei et al., 2016.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 2 de janeiro de 2001, os limites estabelecidos para o padrão microbiológico de hortaliças, legumes e similares in natura é ausência de *Salmonella* sp. em 25 g ou mL. Já para frutas in natura, os limites são de $2x10^3$ UFC/g para coliformes a 45ºC e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g ou mL, assim como para as raízes e tubérculos.

Ceuppens et al (2014) avaliaram a qualidade microbiológica de alfaces produzidas em seis fazendas do Brasil, bem como dos fertilizantes orgânicos utilizados, água de irrigação, solos, caixas utilizadas no transporte e mãos dos manipuladores. Foram isolados *Salmonella* de alface, do adubo, da água e do solo e *E. coli* O157:H7 da água de irrigação. 71,5% dos isolados foram oriundos de uma mesma fazenda de produção orgânica. *E. coli* genérica foi mais detectada em amostras de alface orgânica (23,1% com contagens de 3,22 log UFC/g) que em alfaces convencionais (16,7% com contagens de 2,27 log UFC/g).

Niguma, Pelayo e Oliveira (2017) avaliaram a qualidade microbiológica de alfaces crespas e obtiveram como resultado 12,5% das amostras obtidas em agricultura orgânica fora do limite estabelecido pela legislação brasileira para

coliformes termotolerantes e 2,8% para amostras da agricultura convencional. Foi isolado *Salmonella* de uma amostra de alface convencional. Este panorama mostra a importância da higienização já que qualidade, no setor alimentício, está intimamente relacionada com inocuidade para garantir a segurança de alimentos.

Vegetais minimamente processados (VMP), segundo a Portaria nº90 de 14 de fevereiro de 2017 do Rio Grande do Sul,

> são frutas, legumes ou hortaliças, ou a combinação destas, que tenham sido submetidas a um processamento, o qual pode incluir seleção, corte, fatiamento, lavagem, desinfecção, enxágüe, centrifugação, embalagem e armazenamento, entre outros, permanecendo em estado fresco, com qualidade sensorial adequada e seguro ao consumo.

Na indústria de VMP, a lavagem e desinfecção são as únicas etapas destinadas à redução e/ou eliminação de micro-organismos indesejáveis e, se não for realizada de maneira correta, pode acarretar em surtos alimentares, bem como em contaminações cruzadas durante a preparação desses alimentos (Maffei et al., 2016; Inatsu et al., 2017; Banach et al., 2017). Jensen et al. (2015) e Pérez-Rodríguez et al. (2014) demonstraram que a água de lavagem utilizada durante o processamento desses vegetais, quando contaminada, pode levar à contaminação de lotes subsequentes. E Prado-Silva et al. (2015), em uma meta-análise dos efeitos dos tratamentos sanitizantes para inativação de *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes,* citaram que a eficácia dos procedimentos de lavagem é afetada por diversos fatores, como tipo de sanitizante, tipo de produto e condições de lavagem (tempo de contato, temperatura, reciclo de água, etc.).

Sanitizante, segundo a RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007, “é um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde”. Os sanitizantes clorados são os mais utilizados pela indústria de alimentos por terem um ótimo poder germicida, serem econômicos e de fácil utilização. Em geral, o íon hipoclorito reage com as proteínas da membrana celular afetando o transporte de nutrientes para o interior da célula e causando o extravasamento dos componentes celulares. Já o ácido hipocloroso pode entrar nas células e oxidar tanto as enzimas celulares quanto os grupos sulfídricos, causando morte da célula ou ainda causar mutações das bases pirimidínicas e purínicas do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Massaguer, 2005, p. 193-196). Apesar disso, esses tipos de sanitizantes têm sido, muitas vezes, evitados por gerarem compostos com

efeitos negativos à saúde dos consumidores, como trihalometanos, ácidos haloacéticos e aldeídos, os quais são formados quando o hipoclorito de sódio combina-se com a matéria orgânica (Gómez-López et al., 2014; Banach et al., 2017). Além disso, a presença de matéria orgânica pode reduzir o efeito do santizante sobre os micro-organismos.

Diversos autores, como Finten et al. (2017), Zhang e Yang (2017), Bermúdez-Aguirre e Barbosa-Cánovas (2013), Sagong et al. (2011), Park et al. (2011), entre outros, tem estudado o uso de ácidos orgânicos para redução microbiana como alternativa aos compostos clorados. Esses ácidos já são utilizados pela indústria de alimentos para aumentar o *self-life* de produtos, mas em concentrações maiores podem acidificar o citoplasma da célula bacteriana, destruindo-a (Bermúdez-Aguirre; Barbosa-Cánovas, 2013; Finten et al., 2017). A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos deve-se, provavelmente, a fato de sua forma não dissociada ser capaz de alterar as funções metabólicas dos micro-organismos, inibindo a adenosina trifosfato (ATP), a produção de proteínas e aumento da pressão osmótica (Lues; Theron, 2011). Porém, segundo Park et al. (2011), a eficácia desses compostos depende do patógeno alvo.

O MAPA, na Instrução Normativa Conjunta nº 18, de 28 de maio de 2009 (regulamento técnico para o processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos), permite o uso de compostos clorados, como o hipoclorito de sódio, por exemplo, em contato com alimentos orgânicos, assim como não limita o uso do ácido cítrico, ácido orgânico estudado neste trabalho (Brasil, 2009c).

O Ministério da Saúde, em seu Guia Alimentar Para a População Brasileira (2008), recomenda a utilização de compostos clorados na concentração de 200 ppm (uma colher de sopa para um litro) na higienização de frutas, legumes e verduras. O Governo do Estado do Rio Grande do Sul, através da sua portaria nº90/2017 (Rio Grande do Sul, 2017), dispõe o regulamento técnico de boas práticas de fabricação e de procedimentos operacionais padronizados (POP) aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de frutas e vegetais minimamente processados, a primeira legislação brasileira específica destinada a este fim. Nela, há a especificação de um POP referente ao controle da lavagem e desinfecção desses produtos, o qual deve contemplar todas as etapas da operação, sendo, no mínimo: lavagem, desinfecção e enxágüe, detalhadas com as informações sobre os princípios ativos e concentração dos produtos destinados a desinfecção. Essa

mesma portaria ainda regulamenta que as soluções cloradas devem estar em concentrações de cloro livre de 10 a 50 ppm, com o tempo de contato comprovadamente suficiente para a redução microbiana até níveis seguros e controle da contaminação cruzada entre lotes já sanitizados. Para outros tipos de desinfetantes, o uso é permitido, desde que comprovadamente eficaz. O *Codex Alimentarius* regulamenta que as indústrias de vegetais minimamente processadas podem usar diferentes métodos e produtos para desinfecção (CAC/RCP, 2003).

3.4. *Salmonella* spp.

Salmonella é um gênero bacteriano da família Enterobacteriaceae que causa mais frequentemente doenças de origem alimentar, com elevada morbidade, mortalidade e perdas econômicas. São bastonetes curtos, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos, catalase positivos, oxidase negativos e geralmente móveis com flagelos peritríquios (com exceção apenas da *S*. Gallinarum e da *S*. Pullorum). São fermentadores de glicose, porém não fermentam sacarose e lactose. Sua temperatura ótima de crescimento é de 37ºC, ainda podendo se multiplicar em temperaturas de 5ºC (Holt et al., 1994). Os valores ótimos de pH para esse micro-organismo são aqueles próximos a neutralidade (entre 6,6 e 8,2), sendo abaixo de 4,0 e acima de 9,0 valores considerados bactericidas. Seu habitat natural é o trato intestinal de diversos animais, embora também possa ser encontrado em outras partes do corpo. Dessa forma, podem ser excretados nas fezes, contaminando água, solo, entre outras localidades (Carrasco et al., 2012; Capalonga et al., 2014; Jay, 2005, p. 545-550).

A classificação do gênero *Salmonella* é feita a partir de sua epidemiologia, reações bioquímicas e estrutura antigênica, sendo consideradas apenas duas espécies: *Salmonella bongori*, que possui 18 sorovares e *Salmonella enterica*, que possui mais de 2460 sorovares divididos em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizone*, *houtenae* e *indica*. Todos os sorovares são considerados patogênicos, porém somente cerca de 200 são associados a doenças em humanos, sendo o sorovar Enteritidis o principal causador de infecções alimentares (Holt et al., 1994).

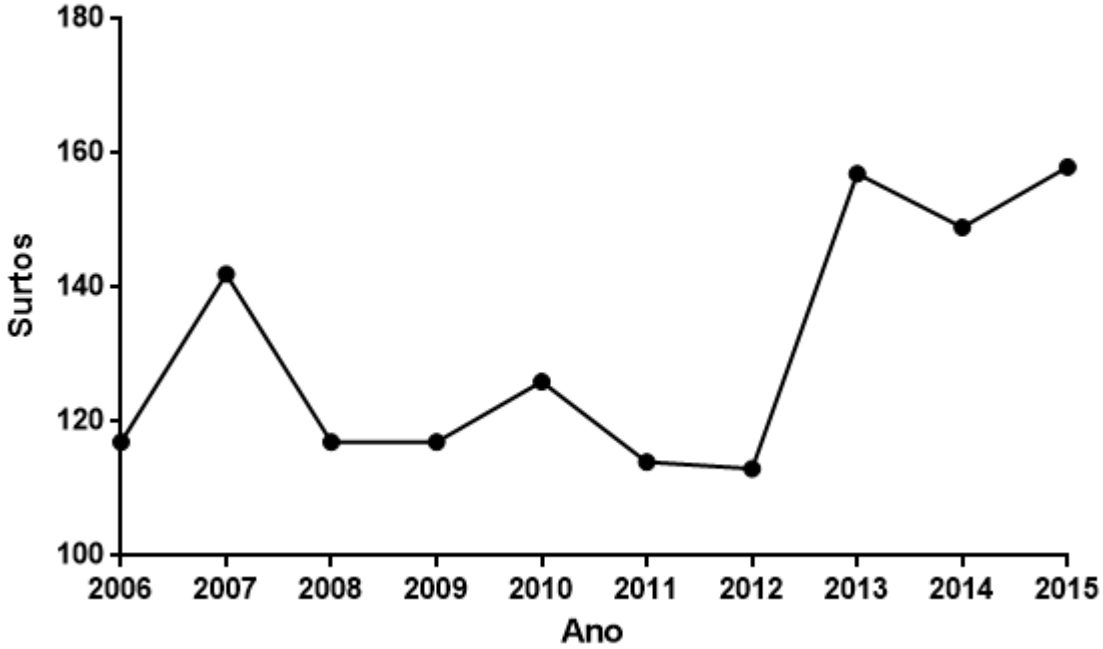
Em geral, um indivíduo é acometido por salmonelose quando consome alimentos que entraram em contato com células de *Salmonella*. Vários fatores podem propiciar a sua multiplicação na matriz alimentícia: temperatura de

armazenamento inadequado, cozimento com temperatura sub-letal ou contaminação cruzada (Carrasco et al., 2012). Dentre os sintomas comuns causados por infecção por *Salmonella* spp., estão diarréia, febre e dor abdominal, que podem se desenvolver entre 12 a 72 horas após a infecção. O tempo de incubação é de 4 a 7 dias. Muitas pessoas se recuperam sem tratamento, mas alguns casos de diarréia grave podem levar à hospitalização. Em casos em que o micro-organismo se espalha pela corrente sanguínea, a salmonelose pode levar ao óbito do paciente (CDC, 2017).

Estima-se que mais de um milhão de pessoas são acometidas por salmonelose por ano nos EUA, com quase 20 mil hospitalizações e 378 mortes (Scallan et al., 2011). Na União Européia 131.468 casos em humanos foram confirmados em 2008 (Carrasco et al., 2012).

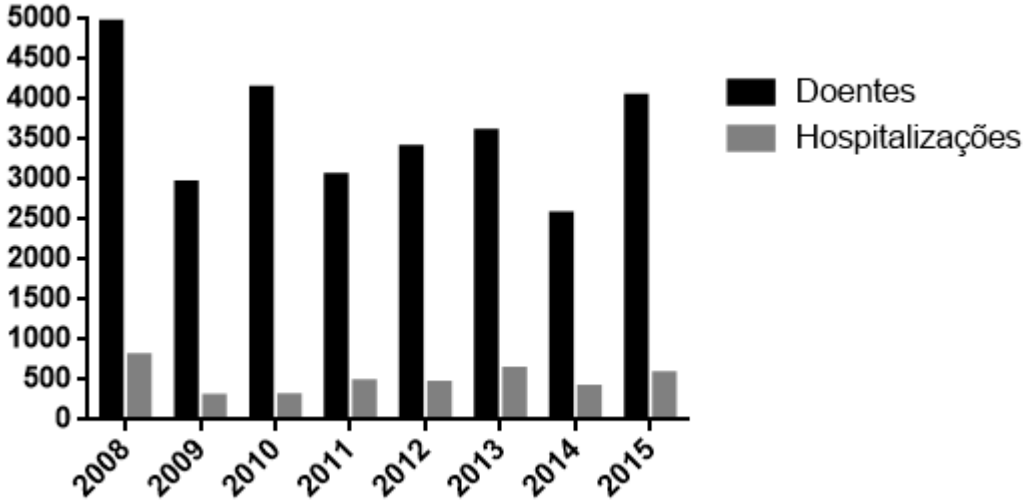
O número de surtos causados por *Salmonella* entre 2006 e 2015 e o número de doentes e hospitalizações por salmonelose entre 2008 e 2015 nos EUA estão nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 – Surtos ocasionados por *Salmonella* entre 2006-2015.



Fonte: Dados do *Centers for Disease Control and Prevention*

Figura 10 – Número de doentes e hospitalizações causadas por salmonelose entre 2008-2015.



Fonte: Dados do *Centers for Disease Control and Prevention*

Produtos de origem animal, como ovos, carnes e derivados, são os veículos mais comuns de salmonelose em humanos (Carrasco et al., 2012). Porém, atualmente há relatos da presença desse gênero bacteriano em vegetais que são destinados ao consumo in natura (Ceuppens et al., 2014; Niguma et al., 2017). De 17 de maio de 2017 a 4 de outubro de 2017, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) relatou 220 pessoas infectadas por cinco tipos de *Salmonella*: Thompson, Kiambu, Agona, Gaminara e Senftenberg em 23 estados dos Estados Unidos após consumo de mamão papaia Maradol. Os investigadores conseguiram isolar as mesmas estirpes de mamões importados de uma fazenda do México. Dentre os acometidos pela doença, 68 foram hospitalizados e uma morte foi relatada em Nova York (CDC, 2017). O *Food and Drug Administration* (FDA) recomendou o *recall* de todas as marcas de mamões papaia importados dessa fazenda em julho de 2017.

Outro caso de surto de *Salmonella* em vegetais foi relatado com contaminação do sorovar Poona em pepinos importados do México e distribuídos por *Andrew & Williamson Fresh Produce*, provável fonte de contaminação neste surto, em 2015. O número de pessoas infectadas chegou a 907 em 40 estados do EUA, com 28% das pessoas sendo hospitalizadas. Seis mortes foram relatadas, mas de acordo com o Departamento de Saúde Pública da Califórnia, duas que ocorreram

no estado não tiveram como fator contribuinte a infecção por *Salmonella*. Além disso, houve 36 casos de pessoas infectadas por *Salmonella* após consumirem brotos de alfafa em nove estados dos Estados Unidos entre maio e setembro de 2016, e outros 28 casos em 12 estados entre novembro de 2015 e abril de 2016 pelo consumo do mesmo vegetal (CDC, 2017).

O método convencional para detecção de *Salmonella* em alimentos é um método qualitativo que visa a observação de presença/ausência do micro-organismo e, apesar de os procedimentos recomendados por diferentes órgãos reguladores apresentarem pequenas variações nos meios de cultura e preparação da amostra, o método tem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento em caldo não seletivo, que tem por objetivo a recuperação de células injuriadas com incubação por pelo menos 18 horas; enriquecimento seletivo, para inibir a multiplicação de alguns micro-organismos acompanhantes na amostra e promover o crescimento de células de *Salmonella*; plaqueamento seletivo diferencial, para promover crescimento de células de *Salmonella* e as diferenciar, por características típicas que sejam diferentes das de outros micro-organismos que possam crescer nesses meios; e confirmação, através de provas bioquímicas e sorológicas (Silva et al., 2010).

Esses métodos convencionais para análise de *Salmonella* spp. em alimentos tem um menor custo quando comparado às tecnologias de identificação por biologia molecular. Porém, os procedimentos podem levar de cinco a sete dias para resultados conclusivos, dificultando diagnósticos rápidos para liberação do lote de um alimento produzido em indústria, identificação de surtos de *Salmonella* e eventos de bioterrorismo e realização de *recall* de produtos (Lee et al., 2015).

Avanços tecnológicos tornaram a detecção de agentes patogênicos mais rápida e com maior sensibilidade, especificidade, eficiência de custo e mão-de-obra, reduzindo erros humanos e custos, além de permitir um maior número de ensaios em um determinado tempo (Park et al., 2014). Os métodos baseados em identificação de ácidos nucléicos são testes de detecção que utilizam uma sequência específica do DNA do micro-organismo alvo e requerem apenas algumas horas, sendo, para *Salmonella*, necessário apenas um pré-enriquecimento antes da análise (que costuma durar 18h) para aumentar a sensibilidade de detecção deste patógeno (Park et al., 2014; Lee et al., 2015).

A técnica baseada em biologia molecular mais conhecida é de amplificação do DNA, reação em cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Ela foi esboçada por Kleppe et al. (1971) e mais tarde desenvolvida por outros autores. Ela permite que, utilizando enzimas DNA-polimerases termoestáveis e oligonucleotídeos iniciadores 5'-3' específicos, pequenas quantidades de DNA em uma grande variedade de alimentos possam ser amplificadas em até 10^7 moléculas após repetidos ciclos. Esse DNA é, então, detectado com a utilização de gel de agarose ou hibridizações em *Southern* (Jay, 2005; Levin, 2010, p. 1-7).

A técnica *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification* (LAMP) é uma técnica semelhante ao PCR desenvolvida pela primeira vez por Notomi et al. (2000) que amplifica o DNA isotermicamente a 60-65ºC, durante 60 minutos. As reações resultam em níveis de amplificação 10^3 vezes ou mais do que na técnica da PCR, além de ser mais rápida, simples e menos dispendiosa (Levin, 2010, p. 22; Lins, 2017). Baseada no LAMP, a *3M Food Safety* criou o método *Molecular Detection System* (MDS-3M) que consegue identificar o micro-organismo alvo através da amplificação isotérmica de DNA com detecção por bioluminescência. Esta metodologia utiliza múltiplos *primers* que reconhecem regiões distintas do DNA. Durante a amplificação pela enzima DNA-polimerase, íons de pirofosfato são liberados como um subproduto, que é convertido em adenosina trifosfato (ATP) pela reação entre a adenosina fosfosulfato e a ATP sulfurilase. Esse ATP reage, então, com a luciferase, produzindo luz que é, então, detectada. Essa metodologia também possui em seus kits controles positivos e negativos, além de controle de matriz de forma a detectar se o alimento está interferindo na detecção (Lins, 2017). Esse método tem demonstrado que, para detecção de *Salmonella*, a concentração mais baixa para resultados analíticos confiáveis é de 1 a 5 UFC/25g de amostra ou *swab*, além de não ter diferença estatística quando comparados a análises de diferentes produtos por metodologias convencionais (Bird et al., 2014).

4. Resultados

Os resultados da presente Dissertação estão apresentados na forma de dois artigos científicos.

Artigo 1: *Salmonella* spp. in lettuce (*Lactuca sativa* L.): prevalence evaluation using Molecular Detection System (MDS-3M).

Artigo 2: *Salmonella* sensitivity to sodium hypochlorite and citric acid in washing water of lettuce residues.

4.1. Artigo 1

Salmonella spp. in lettuce (*Lactuca sativa* L.): prevalence evaluation using Molecular Detection System (MDS-3M)

JUSTO, T.F.[a]; SOUZA,E.B.[a]; MONTEIRO, A.S.N.[a]; SILVA, M.M.N.[b]; TONDO, E.C.[c]; PEREIRA, K.S.[a]

[a]Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ), Av. Athos da Silveira Ramos, 149, CidadeUniversitária, CEP. 21941-909 Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
[b]Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ), Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Cidade Universitária, CEP. 21941-909 Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
[c]Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP. 91.501-970 Porto Alegre/RS, Brasil.

Abstract

The consumption of organic food has increased with the pursuit for healthier products, without the use of pesticides or other products that could affect consumer's health. In this type of cultivation system, it is common to use organic fertilizers containing animal feces, which may allow greater entericsource contamination, if the fertilizers are not adequately composted. Because lettuce is the leafy vegetable most consumed by the Brazilian population and *Salmonella* is one of the main pathogens involving lettuce consumption in the world, this study aimed to evaluate *Salmonella* spp. prevalence in organic lettuce collected at organic food-markets in Rio de Janeiro. 150 samples of organic lettuce were collected, and *Salmonella* spp. analysis was performed using the MDS-3M (Molecular Detection System) and the kit commercialized by the manufacturer. *Salmonella* spp. was detected in one sample, which corresponds to a prevalence of 0.67%. Therefore, good agricultural practices should be implemented in the field to prevent contamination and appropriate methods

of hygiene should be used by consumers even in organic lettuces before consumption.

1. Introduction

Currently, there is a stimulus for fresh products consumption, such as lettuce, the leafy most consumed in Brazil. In addition, consumers have sought products that are healthy, without the use of pesticides or other chemicals that can affect health, such as organic food. The area devoted to organic agriculture has grown in the world. Data from The World Organic Agriculture report of 2017, elaborated by the International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM) and the Research Institute of Organic Agriculture (FIBL), show that 50.9 million hectares were destined for organic production worldwide in 2015 (Willer;Lernoud, 2017). However, organic vegetables may be a concern regarding microbiological quality, since its producers can use organic fertilizers made with animal feces, which can result in greater enteric contamination (Zhang; Yang, 2017; Goodburn; Wallace, 2013). One way to reduce the contamination of these fertilizers by pathogens is to compost them for periods greater than 90 days, however this is not always done or producers add fresh feces to composted fertilizers, re-contaminating them.

Greens, as well as fruits and vegetables, are vehicles of many etiological agents of enteric diseases, with fecal contamination being the most relevant factor (Rodrigues et al., 2014). The main sources of contamination of these foods are irrigation water, soil, manure used as fertilizer and animals (Oliveira et al., 2012; Sant'Ana et al., 2014). Franz and co-workers (2005) showed that *Salmonella enterica* Typhimurium and *E. coli* O157: H7 can survive for long periods (up to months), both in manure and in soils treated with it.

Salmonella is a bacterial genus that most often causes food-borne diseases with high morbidity, mortality and economic losses. It is estimated that more than one million people are affected by salmonellosis per year in the United States, with almost 20,000 hospitalizations and 378 deaths (Scallan et al., 2011). In European Union 131,468 cases in humans were confirmed in 2008 (Carrasco et al., 2012). Although animal products are the most common salmonellosis vehicles in humans, there are many reports of the presence of this bacterial genus in plants that are destined for consumption *in natura* (Sant'ana et al., 2011; Rodrigues et al., 2014; Ceuppens et al., 2014; Marine et al., 2015). *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 have been the main

pathogens found in lettuces (Anderson et al, 2011; Ceuppens et al., 2014). Here upon, the care with hygiene, as well as temperature control during transport and storage and the risk management become important to avoid the presence of biological risks in the product (Sant'ana et al., 2011; Sant'ana et al., 2014).This risk reduction is directly linked to Good Agricultural Practices (GAP) implementation, which are defined internationally by the Codex Alimentarius for fresh fruits and vegetables and includes activities in and around the field, such as workers hygiene, manure composting, water quality and other more (CAC/RCP 53-2003) (Codex, 2003).

Advances in technology have made pathogens detection faster and with greater sensitivity, specificity, cost and labor efficiency, reducing human errors and costs, allowing a greater number of tests in a given time (Park et al., 2014). Methods based on nucleic acids identification are detection tests that use specific sequences of deoxyribonucleic acid (DNA) from a target microorganism and require only a few hours. For the analysis of *Salmonella*, only a pre-enrichment before the analysis (which usually lasts 18 hours) is necessary to increase the detection sensitivity of this pathogen (Park et al., 2014; Lee et al., 2015).

Based on Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP), 3M Food Safety created a Molecular Detection System (MDS-3M) method that can identify a target microorganism through isothermal DNA amplification with bioluminescence detection. This methodology uses multiple primers that recognize distinct regions of DNA. During amplification by DNA polymerase enzyme, pyrophosphate ions are released as a by-product, which is converted to adenosine triphosphate (ATP) by the reaction between adenosine phosphosulfate and ATP sulfurylase. ATPs enable the reaction between luciferin and luciferase to produce light, which is detected by a luminometer and expressed in Relative Light Unit (RLU). This method also has positive and negative controls in its kits as well as matrix control to detect if the food is interfering in detection (Lins, 2017). This method has shown that for *Salmonella* detection, the lowest concentration for reliable analytical results varies from 1 to 5 CFU/25g of sample or swab, besides not having statistical difference when compared to different products analyzed by conventional methodologies (Bird et al., 2014).

Thus, the aim of this study was to evaluate *Salmonella* spp. prevalence in organic lettuce collected at organic food-markets in the city of Rio de Janeiro - RJ/Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Lettuce samples were collected at organic food-markets in the city of Rio de Janeiro/RJ. Three collects were carried out in five different food-markets, and ten lettuce units were obtained in each one, totalizing 150 lettuce samples. The samples were conditioned in isothermic boxes and taken to theLaboratório de Microbiologia de Alimentos (MicrAlim) located in the Escola de Química of Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

2.2. Microbiological analyzes

Lettuce samples first passed through the pre-enrichment stage, which consists of adding of 25 g of sample in 225 mL of buffered peptone water, with subsequent incubation at 37ºC for 18 hours. Then, a 20 µL aliquot of the pre-enriched sample was added to a lysis tube with 580 µL of reagent, required for the cell lysis step. The solution in the tube was stirred vigorously until complete homogenization and heated at 100 °C for 15 minutes.

After this, the tubes were cooled for 10 minutes, homogenized and left to repose for five minutes. This step was also performed with the negative control of the commercialized kit.

After the cell lysis step, 20 µL of the lysed sample was transferred to a test tube containing lyophilized reagents for amplification. The tubes were placed in the equipment and the results were provided within 75 minutes, positive results being detected in real time, identified by color in the MDS software.

Positive results were confirmed by the conventional methodology recommended by the International Organization for Standardization 6579:2007 and the selected typical colonies were sent for serotyping at the Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB), IOC/FIOCRUZ, RJ. The confirmation of the biochemical profile was assessed using the methodology described by Ewing (1986). Tests of gas production in glucose medium, capacity of using citrate as the sole source of carbon in Simons Citrate medium (DIFCO), mobility evaluation, hydrogen sulfide and indole gas production in SIM Medium (DIFCO), and decarboxylation capacity of the amino acid lysine were performed.

3. Results and Discussion

Among the 150 lettuce samples, three were positive for *Salmonella*, according to MDS. After conventional testing, three typical strains of *Salmonella* spp. were sent to Fiocruz for serotyping and only only one strain was confirmed as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for its biochemical profile, which corresponds to a prevalence of 0.67%. The other two strains were confirmed as *Enterobacter cloacae* and *Providencia rettgeri*.

Ceuppens and co-workers (2014), in the south of Brazil, isolated *Salmonella* from organic lettuce, as well as from irrigation water, soil and fertilizer used in organic production. Marine and co-workers (2015) also isolated *Salmonella* from green leaves, from both conventional and organic systems, and was observed that there is a tendency for a specific period of the year (autumn), which may be due to seasonal events not identified in the study, climatic conditions and compost piles proximity as potential sources of contamination. Oliveira and co-workers (2011) isolated *Salmonella* spp. of two chicory samples, which corresponds to a prevalence of 1.2 % of the samples of minimally processed vegetables analyzed. Studying minimally processed vegetables, Sant'ana and co-workers (2011) isolated *Salmonella* spp. of conventional and organic lettuce, arugula and a mixture of leaves (arugula and escarole).

Rodrigues and co-workers (2014) showed, in their studies on microbiological contamination associated with the implementation of Good Agricultural Practices (GAP) in the production of organic lettuce, an indication that the organic lettuce production chain in the south of Brazil is susceptible to microbiological safety issues when basic levels of good agricultural practice are not controlled.

These authors isolated *Salmonella* from organic lettuce, noting that the sanitary quality of irrigation water and the composting of manure used as organic fertilizer were not adequately controlled and the waiting times before application as fertilizer were not respected.

4. Conclusion

The results indicated a need for vegetable production to have programs that identify controls at different stages, from planting to consumption, to guarantee the safety of these products. Therefore, it is necessary to implement GAPs in the field,

such as workers hygiene, manure composting by appropriate times, water quality and other cares. Besides that, it is essential the hygiene of lettuces by the consumer, even if it is organic, before consumption.

Acknowledgments

The authors are grateful to the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), to the company 3M Food Safety for borrowing the 3M MDS® equipment for molecular analysis and to Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (IOC/FIOCRUZ) for support analyzes that contributed to this study.

References

Anderson, M., Jaykus, L. A., Beaulieu, S., Dennis, S. (2011). Pathogen-produce pair attribution risk ranking tool to prioritize fresh produce commodity and pathogen combinations for further evaluation (P3ARRT). *Food Control*, 22, 1865-1872.

Bird, P.; Fisher, K.; Boyle, M.; Huffman, T.; Benzinger, M. J.; Bedinghaus, P., Flannery, J.; Crowley, E.; Agin, J.; Goins, D. (2014). Evaluation of modification of the 3M molecular detection assay (MDA) *Salmonella* method (2013.09) for the detection of *Salmonella* in selected foods: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, *97*(5), 1329–1342.https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-101

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, *45*(2), 545–556. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004

Ceuppens, S., Hessel, C. T., De Quadros Rodrigues, R., Bartz, S., Tondo, E. C., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *181*, 67–76. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025

Codex Alimentarius. (2003). *Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables.*

Ewing, W. H., 1986: Serological Identification of *Salmonella*. In: Ewing, W. H. (ed.), Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th edn., pp. 201–238, Elsevier Science Publishing Co, Inc, New York.

Franz, E., Diepeningen, A. D. Van, Vos, O. J. De, & Bruggen, A. H. C. Van. (2005). Effects of Cattle Feeding Regimen and Soil Management Type on the Fate of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Manure , Manure-Amended Soil , and Lettuce Effects of Cattle Feeding Regimen and Soil Management Type on th. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(10), 6165.6174. https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6165

Goodburn, C., & Wallace, C. A. (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*, *32*(2), 418–427. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.012

Lee, K. M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, *47*, 264–276. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011

Lins, P. (2017). Detection of *Salmonella* spp. in spices and herbs. *Food Control*, *83*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.040

Marine, S. C.; Pagadala, S.; Wang, F.; Pahl, D. M.; Melendez, M. V.; Kline, W. L.; Oni, R.A.; Walsh, C.S.; Everts, K.L.; Buchanan, R.L.; Micallef, S. A. (2015). The growing season, but not the farming system, is a food safety risk determinant for leafy greens in the Mid-Atlantic Region of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, *8,* 2395–2407. https://doi.org/10.1128/AEM.00051-15

Oliveira, M., Viñas, I., Anguera, M., & Abadias, M. (2012). Fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of natural background microbiota on conventional and organic lettuce. *Food Control*, *25*(2), 678–683. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.002

Park, S. H., Aydin, M., Khatiwara, A., Dolan, M. C., Gilmore, D. F., Bouldin, J. L., … Ricke, S. C. (2014). Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiology*, *38*, 250–262. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.002

Rodrigues, R.Q.; Loiko, M. R.; de Paula, C.M.D.; Hessel, C. T.; Jacxsens, L.; Uyttendaele, M.; Bender, R.J.; Tondo, E. C. (2014). Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control*, *42*, 152–164. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.043

Sant'Ana, A. S., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. G. M. (2011). Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. *Food Microbiology*, *28*(6), 1235–1237. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.04.002

Sant'Ana, A. S., Franco, B. D. G. M., & Schaffner, D. W. (2014). Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. *Food Control*, *42*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.028

Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F. J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M. A.; Roy, S. L., Jones, J.L.; Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(1), 7–15. https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101

Willer, Helga; Lernoud, Julia (Eds.) (2017): The World of Organic Agriculture.

Statistics and Emerging Trends 2017. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and IFOAM – Organics International, Bonn. Version 1.3 of February 20, 2017.

Zhang, J., & Yang, H. (2017). Effects of potential organic compatible sanitisers on organic and conventional fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa* Var. Crispa L). *Food Control*, *72*, 20–26. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.030

4.2. Artigo 2

Salmonella sensitivity to sodium hypochlorite and citric acid in washing water of lettuce residues

JUSTO, T.F.[a]; MORETTI, L.K.[a]; SILVA, M.M.N.[c], TONDO, E.C.[b]; PEREIRA, K.S.[a]

[a]Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ), Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Cidade Universitária, CEP. 21941-909 Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
[b]Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP. 91.501-970 Porto Alegre/RS, Brasil.
[c]Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ), Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Cidade Universitária, CEP. 21941-909 Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

Abstract

Salmonella spp. is one of the main lettuce pathogens and should be inactivated during the disinfection of these vegetables before consumption. In minimally processed vegetable industries, residues of organic matter can prevent the inactivation of this pathogen by disinfectants. The objective of the present work was to evaluate the inactivation of *Salmonella* isolated from organic lettuce to sodium hypochlorite (25 ppm and 50 ppm) and citric acid (0.5% and 1%) in washing water added with lettuce residues. To do so, a washing water with lettuce residues was elaborated, and *Salmonella* was added in the order of 10^6 CFU/mL. Thereafter, each sanitizer was added separately to evaluate its effect on reducing *Salmonella* counts. After one, two, three, four, five, 10 and 15 minutes of contact with the sanitizers, serial dilutions using neutralizer (0.5% sodium thiosulphate) were performed and each dilution was sown in Xylose-Lysine-Desoxycholate medium (XLD). Total aerobic mesophilic counts of wash water with lettuce residues before testing (without *Salmonella*) and after 15 minutes of exposure to each sanitizer (with *Salmonella*)

were also performed. In addition, the free chlorine still present in the samples after the contact of sodium hypochlorite with lettuce residues for 15 minutes. The results demonstrated that 50 ppm and 25 ppm sodium hypochlorite could reduce 6 log CFU/mL of *Salmonella* in one and three minutes of contact, respectively, while 0.5% and 1% citric acid was able to reduce 1.26 log CFU/mL and 1.74 log CFU/mL respectively from the same microorganism . The total aerobic mesophilic counts of the wash water before being tested were, on average, 1.5 log CFU/mL. After addition of *Salmonella*, with 15 minutes of contact with the sanitizer, the results of total counts showed the same magnitude as the *Salmonella* counts. Organic matter may have reacted with the free chlorine present, reducing chlorine concentrations, since values of 30.4 ppm were observed when the initial concentration should be 50 ppm and 17.1 ppm when the initial concentration should be 25 ppm. Based on the results, sodium hypochlorite demonstrated a greater microbial reduction capacity in wash water with lettuce residues, indicating that it is more appropriate to avoid cross-contamination between batches during sanitation of lettuce in washing tanks.

Keywords: *Salmonella*, Lettuce, Organic Food.

1. Introduction

Water used for decontamination of minimally processed vegetables can be a source of cross-contamination when different batches of vegetables are processed in the same tank and the sanitizer used does not control possible viable pathogens.In the production chain of minimally processed leafy vegetables, washing and disinfection with disinfectant solutions are the only steps capable of reducing or inactivating pathogenic microorganisms, therefore, these are essential steps to ensure the safety of these products. *Salmonella* spp. is mostly recognized as the cause of outbreaks involving consumption of vegetable products *in natura* (Rossi et al., 2016; Faour-Klingbeil et al., 2016), so the evaluation of its inactivation by sanitizers commonly used in minimally processed vegetable industries is of utmost interest. The application of disinfectants by these industries aim to control cross-contamination between batches of processed vegetables in the washing water at the tanks, not necessarily inactivating the microorganisms present on the leaves, which will be removed mechanically passing water through the leaves (Gil et al., 2009; Luo et al., 2011; Gomes-Lopez et al., 2014).

The industry of minimally processed vegetables employs mainly chlorinated sanitizers since they have recognized germicidal power, low-price and are easy to use. Among the possibilities, sodium hypochlorite is the most common choice (Gil et al., 2009). However, this sanitizing agent has been criticized for generating carcinogenic compounds, such as trihalomethanes, halo acetic acids and aldehydes, formed when sodium hypochlorite and other chlorinated compounds are combined with organic matter (Banach et al., 2017; Gomez -López et al., 2014). In addition, the presence of organic matter may reduce the effect of the sanitizer on microorganisms, compromising the safety of these products.

A viable alternative to avoid the use of chlorinated compounds is the use of organic acids, for instance, citric acid. This acid is already applied by the food industry to increase the self-life of products, and at higher concentrations, it can acidify the cytoplasm of bacterial cells, causing their death (Bermudez-Aguirre &Barbosa-Canovas, 2013; Finten et al., 2017). Another advantage of citric acid over chlorinated products is its possible acceptance by consumers of organic products, as citric acid is not considered a chemical hazard, which occurs with chlorinated products. However, the effectiveness of microbial inactivation of organic acids should be evaluated as it depends on the target pathogen, the concentrations used and the presence of organic matter in the washing water (Park et al., 2011).

Therefore, this study evaluates the reduction of *Salmonella* concentration in washing water of lettuce residues implementing 0.5% and 1% citric acid solutions with different times of exposure and comparing to industrial standard, 25 ppm and 50 ppm sodium hypochlorite solutions, to improve this process in a more sustainable way.

2. Methodology

2.1. Inoculum preparation

A strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from organic lettuce was applied in this work. It was selected and identified by Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB), IOC / FIOCRUZ, RJ, Brazil, by the confirmation of the biochemical profile, evaluated through methodology described by Ewing (1986). Tests of gas production in glucose medium, capacity of using citrate as single carbon source in Simons Citrate medium (DIFCO), mobility evaluation,

hydrogen sulphide and indol production in SIM Medium (DIFCO) and Lysine decarboxylation capacity were performed.

Prior to the experiments, the isolated strain was kept on nutrient agar (HiMedia®, India) at 4°C. For reactivation and inoculum preparation, the isolated was cultured in Brain Heart Infusion broth (BHI, HiMedia®, India) and incubated at 35°C for 24h. The final concentration of cells in the BHI medium was of the order of 10^9CFU/mL.

2.2. Preparation of washing water added of lettuce residues

To simulate the reality of washing water from minimally processed vegetable (MPV) industries, which often contain residues of vegetable organic matter, a washing water solution was created. For that, 10 g of lettuce were added to an Erlenmeyer flask containing 90 mL of sterile distilled water. This solution was heated to 65°C for 3 min in a water bath, followed by an ice bath cooling. The chemical oxygen demand (COD) was analyzed by the measurement of the photometric standard (APHA, 1998) using a spectrophotometer DR-2800 (Hach). Distilled water was used as a blank control.

2.3. Evaluation of *Salmonella* sensitivity to sanitizers in washing water added of lettuce residues

To the 90 mL of solution prepared as described in item 2.2, 210 mL of each sanitizer were added, obtaining the following concentrations in the wash water: 50 ppm sodium hypochlorite (SH), 25 ppm SH, 0.5% citric acid (CA) and 1% CA, totalizing 300 mL of washing water solution. Then, for each solution of washing water with lettuce residues and sanitizers, 30 µL of *Salmonella* suspension was inoculated. This suspension was prepared as described in item 2.1, resulting in a final concentration of 10^6 CFU/mL of this microorganism. After exposure times of one, two, three, four, five, 10 and 15 minutes, a 1 mL aliquot was withdrawn and transferred to a tube containing 9 mL of neutralizing diluent (0.5% sodium thiosulfate and 0.1% peptone). A blank experiment, without the use of sanitizer, was also performed as a control. The experiment was repeated twice for each treatment.

2.4.Microbiological experiments

The enumeration of *Salmonella* after each treatment with sanitizers was done performing serial decimal dilutions, with 0.5% sodium thiosulfate and 0.1% peptone in all dilution tubes. Each one was seeded in Xylose-Lysine-Desoxycholate medium (XLD) by dropping technique, adding 10 µL to the culture medium, and 10^{-1} dilutions were also seeded on the surface (V = 0.1 mL) to increase the detection of the method, all in duplicates. The plates were incubated at 35°C for 24 h and counting was done manually, and the results were expressed in Colony Forming Units per mL (CFU/mL).

Total aerobic mesophilic count of washing water with lettuce, before being submitted to the experiment (item 2.2) and at the end of 15 minutes contact with the sanitizer, were also performed on Plate Count Agar (PCA, Difco ®, France) with incubation at 35°C for 48h.

2.5.Free chlorine

Free chlorine was measured by the oxidation titrimetric method (iodometry), described by Vogel (1992). This analysis was performed initial sodium hypochlorite solutions to test *Salmonella* sensitivity, as well as on the solutions initially with 50 ppm and 25 ppm of sodium hypochlorite, after 15 minutes contact with the lettuce solution, without addition of *Salmonella* (item 2.3).

2.6.Statistical analyses

The counts results were expressed as average ± standard deviation. A two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test was performed to verify the difference of microbial reductions, in relation to the types of sanitizers and their concentrations, as well as the time of exposure to them. A t-test was also performed to verify significant differences between the COD of the distilled water and the solution containing lettuce residues. All analyzes were conducted in GraphPad® Prism 6 software, with a confidence level of 95%.

3. Results and discussion

The chemical oxygen demand present in the water with lettuce residues corresponded to 88.53 mg/L (Figure 1), being significantly different to the result in distilled water, which corresponded to 5.72 mg/L ($p<0.05$). The organic matter

present may influence directly the reactions with free chlorine (Nyati et al., 2012; Murray et al., 2018), thus it should be reduced to minimum in the washing water, removing wastes and leftovers from vegetables in industries tanks . Figure 2 shows the concentration of free chlorine before and after 15 minutes of contact with lettuce residues, demonstrating that organic matter may have reacted with free chlorine, reducing chlorine concentrations, since 17.1 ppm and 30.4 ppm were found when the initial concentration should be 25 ppm and 50 ppm, respectively.

Figure 1 – Chemical Oxygen Demand (COD) determined in washing water added of lettuce residues.

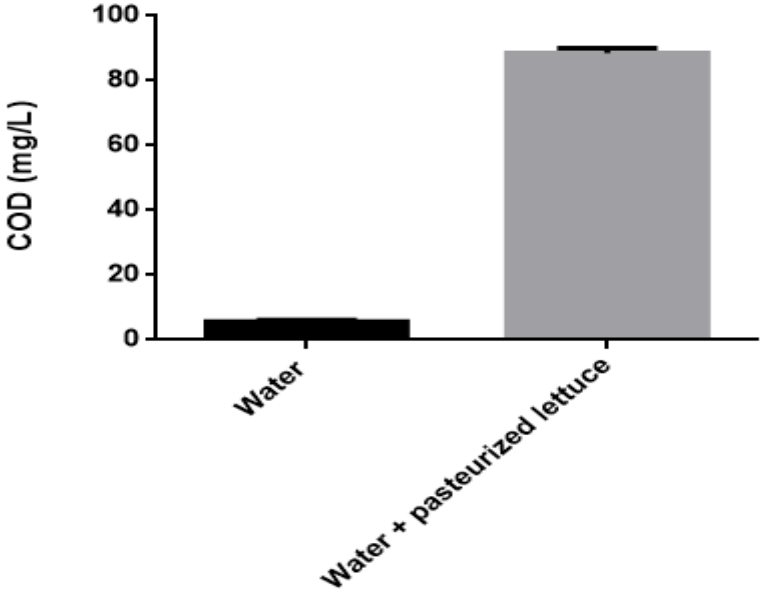


Figure 2 – Concentration of free chlorine before and after 15 minutes of exposure to washing water added of lettuce residues for each sodium hypochlorite treatment.

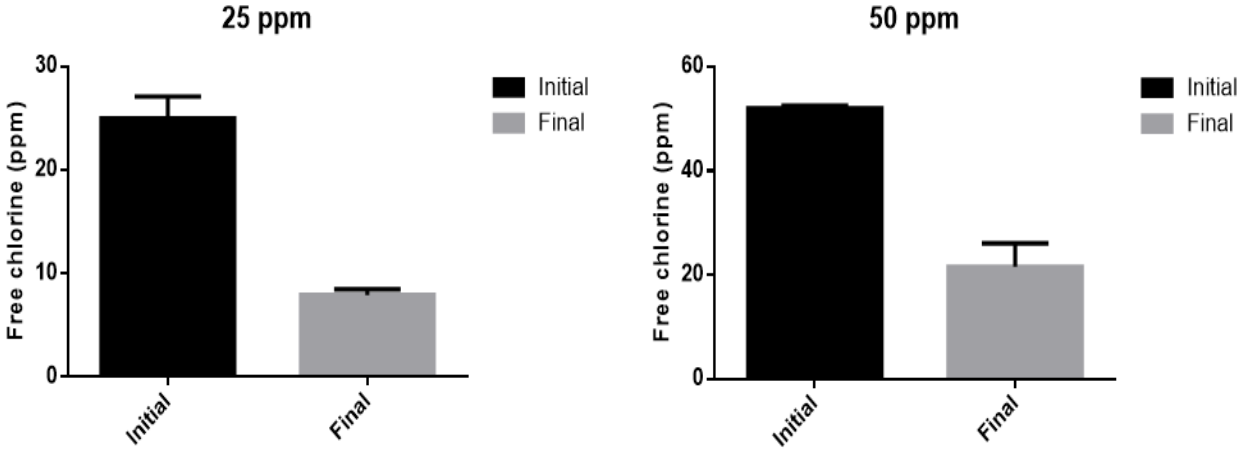


Figure 3 shows the initial total aerobic mesophilic counts of washing water with lettuce residues before being inoculated with *Salmonella* to be submitted to each treatment. The counts were 1.70 log CFU/mL for the samples used for the test with 25 ppm SH, 1.59 log CFU/mL for the SH 50 ppm test, 1.40 log CFU/mL for the test with 0.5% CA and 1.33 log CFU/mL for the test with 1% CA. These counts were low, less than the amount of *Salmonella* added (10^6 CFU/mL), reducing the possibility of interference of natural lettuce microbiota on *Salmonella* inactivation results. The lettuce residue solution heating was applied for this purpose.

Figure 3 – Initial total aerobic mesophilic counts of washing water solutions added of lettuce residues before being inoculated with *Salmonella* and treated with 25 ppm sodium hypochlorite (SH - 25 ppm), 50 ppm sodium hypochlorite (SH - 50 ppm), 0.5% citric acid (CA - 0.5%) and 1% citric acid (CA - 1%).

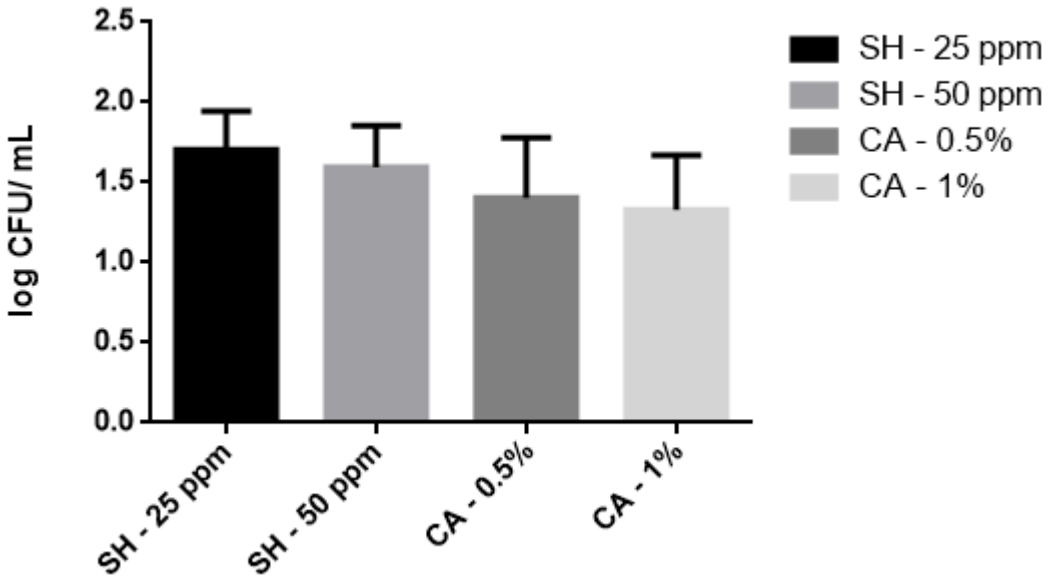


Table 1 shows *Salmonella* counts before and after each treatment with sodium hypochlorite and citric acid and Figure 4 shows the total PCA medium count, after 15 minutes of exposure to each sanitizer.

Table 1 – Survival of *Salmonella* after different exposure times at 25 ppm sodium hypochlorite (SH - 25 ppm), 50 ppm sodium hypochlorite (SH - 50 ppm), 0.5% citric acid (CA - 0.5% and 1% citric acid (CA - 1%) in wash water with lettuce residues.

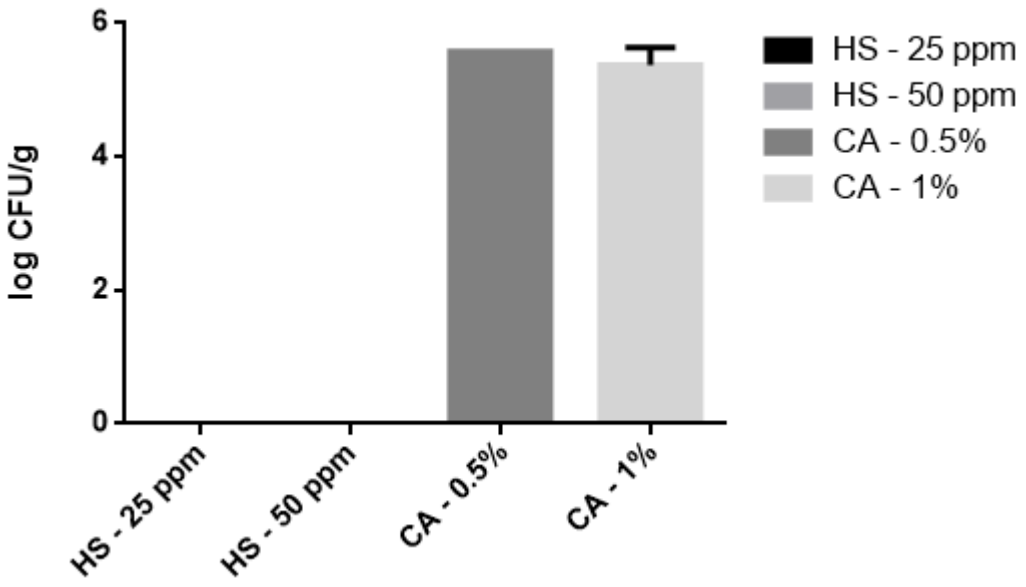
	Microbial loads (log CFU/mL)				
Time (min)	**Control**	**SH - 25 ppm**	**SH - 50 ppm**	**CA - 0,5%**	**CA - 1%**
0	$6.23 \pm 0.12^{A,a}$	$6.15 \pm 0.21^{A,a}$	6.15 ± 0.21^{A}	$6.31 \pm 0.01^{A,a}$	$6.31 \pm 0.01^{A,a}$
1	$6.20 \pm 0.08^{A,a}$	$3.91 \pm 0.02^{C,b}$	n.d.	$5.62 \pm 0.05^{B,b}$	$5.61 \pm 0.12^{B,b}$
2	$6.20 \pm 0.08^{A,a}$	$2.60 \pm 0.00^{C,c}$	n.d.	$5.54 \pm 0.14^{B,b}$	$5.00 \pm 0.20^{B,b}$
3	$6.02 \pm 0.17^{A,a}$	n.d.	n.d.	$5.25 \pm 0.49^{B,b}$	$5.21 \pm 0.26^{B,b}$
4	$6.08 \pm 0.05^{A,a}$	n.d.	n.d.	$4.98 \pm 0.55^{B,b}$	$5.04 \pm 0.07^{B,b}$
5	$6.13 \pm 0.02^{A,a}$	n.d.	n.d.	$5.04 \pm 0.20^{B,b}$	$4.99 \pm 0.06^{B,b}$
10	$5.98 \pm 0.03^{A,a}$	n.d.	n.d.	$5.16 \pm 0.08^{B,b}$	$5.12 \pm 0.49^{B,b}$
15	$6.00 \pm 0.06^{A,a}$	n.d.	n.d.	$5.05 \pm 0.07^{B,b}$	$4.57 \pm 0.68^{C,c}$

Different capital letters on the same line: different values significantly ($p < 0.05$).

Different lowercase letters in the same column: different values significantly ($p < 0.05$).

* n.d .: Not detected

Figure 4 – Total aerobic mesophilic count of wash water solutions added of lettuce residues at the end of 15 minutes in contact with 25 ppm sodium hypochlorite (SH - 25 ppm), 50 ppm sodium hypochlorite (SH - 50 ppm) , 0.5% citric acid (CA - 0.5%) and 1% citric acid (CA - 1%) after being inoculated with *Salmonella*.



The initial *Salmonella* counts submitted to each treatment was about 6 log CFU/mL and, thus, it was possible to observe reductions in all treatments, both with sodium hypochlorite and with citric acid. Using sodium hypochlorite 25 ppm and 50 ppm, the total inactivation (6 log CFU/mL) occurred in three and one minutes, respectively.

The total counts presented the same results after 15 min (Figure 4). Murray and co-workers (2018) evaluated the sensitivity of *Salmonella* and other pathogens to free chlorine from post-harvest commercial wash water in a tank with low concentrations of free chlorine, which fluctuated between 4 and 27 ppm. *Salmonella* was sensitive, having a reduction of 3.91 log CFU/mL after 30 seconds of contact. Wan Norhana and co-workers (2010) also evaluated planktonic cells of *Salmonella* in water, without organic matter, and after 30 seconds of contact, it was not possible to detect the microorganism, which initially was 6.25 log CFU/mL. Gomez-Lopez and co-workers (2014) evaluated the washing water used for decontamination of fresh coriander with *E. coli* with COD of 515 mg/L and found that concentrations of 3 and 5 ppm of free chlorine were sufficient for microbial reduction of the 3 log and 4 log CFU/mL after 10 minutes, respectively, and, after 15 minutes, both concentrations achieved reductions of 5 log CFU/mL. Banachand co-workers (2017) evaluated the reduction of *Salmonella Typhimurium* in contact with 10 ppm of sodium hypochlorite and, after a few seconds, a reduction of 4 log CFU/mL could be observed.

Citric acid demonstrated lower reductions in *Salmonella* counts (Table 1). Up to 10 min of exposure, concentrations of 0.5% and 1% of citric acid were not significantly different, and after 15 minutes the 1% concentration obtained a slightly higher reduction (of 1.74 log CFU/mL) than the 0.5% concentration (1.26 log CFU/mL). Park and co-workers. (2011) obtained a reduction of 3.19 log CFU/g after sanitizing lettuce contaminated with *Salmonella* with 1% citric acidfor 10 minutes. Sagong and co-workers (2011) demonstrated a reduction of 1.77 log CFU/g of *Salmonella Typhimurium* in organic lettuces after five minutes of contact with 1% of citric acid.

The difference between the use of sodium hypochlorite and citric acid was significant ($p < 0.05$). Sodium hypochlorite has proven to be more effective and therefore the best choice for controlling washing water. However, citric acid could also be used when in communities, such as some groups of consumers of organic foods, that avoid the use of chlorine to generate possible compounds that are harmful to health.

The Government of Rio Grande do Sul state, by their law (Portaria N°. 90/2017), establishes the technical regulation of good practices of manufacturing and standard operating procedures (SOPs) applied for establishments of minimally processed fruit and vegetable processing, being the first specific Brazilian legislation

intended for this purpose. This regulation is specific for the control of washing and disinfection of such fruit and vegetables, contemplating all the operation steps, e.g.: washing, disinfection and rinsing. Also, details on the active principles and the concentration of the products intended for disinfection must be described, such as residual free chlorine and the pH of water solution and vegetables that enter the washing tank. This same regulation states that chlorine solutions must have free chlorine concentrations of 10 to 50 ppm, with time of exposure proven sufficient for microbial reduction to safe levels and control of cross contamination between batches already sanitized. Other types of disinfectants or technologies can be used for the disinfection of fruits and vegetables, if proven effective. Codex Alimentarius recommends that minimally processed vegetable industries may use different methods and products for disinfection (CAC/RCP, 2003).

As already mentioned, controlling washing water by reducing the amount of organic matter, soil and microorganism contamination, as well as maintaining free chlorine or other products in the tanks is of great importance to avoid cross-contamination between batches being sanitized in minimally processed vegetable industries. Chlorinated compounds are often very efficient for microbial reduction, even at low concentrations, as demonstrated by the present study. Due to the fact that they can generate compounds possible harmful to health, we have sought alternatives for their replacement. However, this choice should be made with caution, since citric acid, for example, did not show the same *Salmonella* reduction as sodium hypochlorite.

4. Conclusion

The sanitizers used in the present study were effective for *Salmonella enterica* subsp.*enterica* inactivation. Sodium hypochlorite at 25 ppm and at 50 ppm was more effective than citric acid in concentrations of 0.5% w/v and 1% w/v. In addition, organic matter reduced chlorine levels, but residual levels were sufficient to inactivate 6 log CFU/mL *Salmonella*. The vegetables washing water should be controlled to obtain concentrations of sanitizers that avoid cross-contamination when different batches of vegetables are processed in the same tank.

Acknowledgement

The authors are thankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and to Laboratório de Tecnologia de Alimentos (EQ/UFRJ), Laboratório de Tratamento de Águas e Reúso de Efluentes (EQ/UFRJ) and Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (IOC/FIOCRUZ) for the support in analyzes that contributed to this study.

References

APHA (American Public Health Association). (1998). Standard methods for the examination of water and waste water (20th ed.). Washington DC: American Public Health Association.

Banach, J. L., van Bokhorst-van de Veen, H., van Overbeek, L. S., van der Zouwen, P. S., van der Fels-Klerx, H. J., & Groot, M. N. N. (2017). The efficacy of chemical sanitizers on the reduction of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* affected by bacterial cell history and water quality. *Food Control*, *81*, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.044

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2013). Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*, *29*(1), 82–90. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.073

CAC/RCP 53 (2003) Codex Alimentarius Comission. Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables. pp. 1–27. Available at: www.fao.org/input/download/standards/.../CXP_053e_2013.pdf. Acesso em 08 janeiro 2018.

Finten, G., Agüero, M. V., & Jagus, R. J. (2017). Citric acid as alternative to sodium hypochlorite for washing and disinfection of experimentally-infected spinach leaves. *LWT - Food Science and Technology*, *82*, 318–325. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.047

Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F., & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, *134*(1–2), 37–45. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021

Gómez-López, V. M., Lannoo, A. S., Gil, M. I., & Allende, A. (2014). Minimum free chlorine residual level required for the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and trihalomethane generation during dynamic washing of fresh-cut spinach. *Food Control*, *42*, 132–138. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.034

Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E., Feng, H., Abadias, M; Conway, W. (2011). Determination of Free Chlorine Concentrations Needed To Prevent *Escherichia coli* O157:H7 Cross-Contamination during Fresh-Cut Produce Wash. *Journal of Food Protection*, *74*(3), 352–358. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-429

Murray, K., Aldossari, H., Wu, F., & Warriner, K. (2017). Dynamic changes in free-chlorine levels within a commercial post-harvest wash and prevention of cross-contamination between shredded lettuce batches. *Food Control*, *85*, 127–134. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.09.029

Nyati, H. (2012). Influence of Organic Material and Biofilms on Disinfectant Efficacy Against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Studies*, *1*(1), 76–84. https://doi.org/10.7455/ijfs/1.1.2012.a8

Park, S. H., Choi, M. R., Park, J. W., Park, K. H., Chung, M. S., Ryu, S., & Kang, D. H. (2011). Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. *Journal of Food Science*, *76*(6). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02205.x

Rio Grandedo Sul. Secretaria Estadual de Saúde. Portaria Nº 90, de 14 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 [do] Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, terça-feira, 14 de fevereiro de 2017.

Rossi, E. M., Beilk, L., Kochhann, M., Sarzi, D. H., Tondo, E.C. (2016). Biosurfactant Produced by *Salmonella* Enteritidis SE86 Can Increase Adherence and Resistance to Sanitizers on Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L.,*cichoraceae*). Frontiers in Microbiology, v.7, n.9.

Sagong, H. G., Lee, S. Y., Chang, P. S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. J., & Kang, D. H. (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 287–292. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.010

Vogel, A I. Análise Química Quantitativa, 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, p. 314-330

Wan Norhana, M. N., Poole, S. E., Deeth, H. C., & Dykes, G. A. (2010). The effects of temperature, chlorine and acids on the survival of *Listeria* and *Salmonella* strains associated with uncooked shrimp carapace and cooked shrimp flesh. *Food Microbiology*, *27*(2), 250–256. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.008.

5. Discussão Geral

Atualmente, com a maior busca por alimentos mais saudáveis, bem como um maior interesse por produtos que tenham praticidade de preparo e consumo, há um aumento do consumo de vegetais in natura e minimamente processados. O consumo de alimentos orgânicos também tem crescido consideravelmente. Dessa forma, deve-se ter um cuidado com a produção desses alimentos, de forma que haja programas que identifiquem os pontos críticos de controle nas etapas de produção, desde a plantação até a distribuição, de forma a assegurar a segurança destes alimentos ao consumidor.

O presente trabalho mostrou uma prevalência de 0,67% de *Salmonella* spp. em alfaces orgânicas coletadas em feiras destinadas à venda de produtos desse tipo de cultivo no município do Rio de Janeiro, mostrando que, apesar desse micro-organismo não ser comum nesse tipo de alimento, vegetais podem ser contaminados por ele por diversas fontes, principalmente por esterco, que é utilizado como fertilizante nesse tipo de produção.

A lavagem e desinfecção desses vegetais é a única etapa no processamento que visa a redução e/ou eliminação de micro-organismos patogênicos e o controle da água de lavagem reduzindo a quantidade de matéria orgânica, sujidades e micro-organismos, bem como a manutenção de cloro livre nos tanques é de grande importância para evitar contaminações cruzadas entre lotes que estão sendo higienizados nessas indústrias. Os compostos clorados costumam ser muito eficientes para a redução microbiana, mesmo em baixas concentrações. No presente estudo, concentrações de 25 ppm e 50 ppm de hipoclorito de sódio foram capazes de reduzir 6 log UFC/mL de *Salmonella* spp. na água de lavagem adicionada de resíduos de alface em poucos minutos de contato (três e um minuto de contato, respectivamente).

Atualmente, tem-se buscado alternativas para a substituição de compostos clorados. Porém, essa escolha deve ser feita com cautela, uma vez que o ácido cítrico, por exemplo, não apresentou a mesma redução de *Salmonella* que o hipoclorito de sódio, tendo uma redução de 1,26 log UFC/mL quando uma concentração de 0,5% foi utilizada e de 1,74 log UFC/mL quando a concentração foi de 1%, ambas após 15 minutos de contato.

Sendo assim, a elaboração de regulamentos que estabeleçam programas de implementação de boas práticas de fabricação e de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores de vegetais minimamente processados no Brasil se faz necessária.

6. Conclusão

- Foi detectada uma prevalência de 0,67% (1/150) de *Salmonella* spp. nas amostras de alfaces orgânicas analisadas;
- A água de lavagem adicionada de resíduos de alface com 25 ppm e 50 ppm de hipoclorito de sódio foi capaz de obter uma redução de 6 log UFC/mL de *Salmonella* spp após três e um minuto de contato, respectivamente.
- Já quando a água de lavagem foi adicionada de 0,5% e 1% de ácido cítrico, foi possível obter uma redução de *Salmonella* spp. de 1,26 log UFC/mL e 1,74 log UFC/mL ao final de 15 minutos de contato, respectivamente.

Referências

ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. *2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil*. Ano base de 2012. Holambra, 29 de maio de 2014.

Banach, J. L.; Van Bokhorst-van de Veen, H.; Van Overbeek, L. S.; Van der Zouwen, P. S.; Van der Fels-Klerx, H. J.; Groot, M. N. N. The efficacy of chemical sanitizers on the reduction of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* affected by bacterial cell history and water quality. *Food Control*, v. 81, p.137–146, 2017.

Bermúdez-Aguirre, D.; Barbosa-Cánovas, G. V. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*, v.*29, n.*1, p.82–90, 2013.

Bird, P.; Fisher, K.; Boyle, M.; Huffman, T.; Benzinger, M. J.; Bedinghaus, P., Flannery, J.; Crowley, E.; Agin, J.; Goins, D. Evaluation of modification of the 3M??? molecular detection assay (MDA) Salmonella method (2013.09) for the detection of Salmonella in selected foods: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.97, n.5, p.1329–1342, 2014.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre o *Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01.rdc.ht m>. Acessado em: 6 mai. 2014. Acesso em 15 de junho de 2016.

Brasil. Presidência da República. Lei 10.831 de 23 de dezembro de 2003. *Dispõe sobre a certificação e o controle de qualidade orgânica*. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/2003/L10.831.htm. Acesso em 15 de junho de 2016.

Brasil. Presidência da República. Decreto 6.323 de 27 de dezembro de 2007. *Regulamenta a Lei Federal 10.831/03.* Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm. Acesso em 15 de junho de 2016.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº. 14, de 28 de fevereiro de 2007, *Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06*. Disponível em: http://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201611/08140937-rdc-14-2007.pdf. Acesso em 20 de janeiro de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 50, de 5 de novembro de 2009 (2009a). *Institui o selo único oficial do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa, e estabelece os requisitos para a sua utilização nos produtos orgânicos*. Disponível em

http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-50-de-05-de-novembro-de-2009-selo-federal-do-sisorg.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 17, de 28 de maio de 2009 (2009b) *Normas técnicas para a obtenção de produtos orgânicos oriundos do extrativismo sustentável orgânico*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-conjunta-mapa-mma-no-17-de-28-de-maio-de-2009-extrativismo-sustentavel-organico.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 18, de 28 de maio de 2009 (2009c) *Regulamento técnico para processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-18-de-28-de-maio-de-2009-alterada-pela-in-no-24-11-processamento.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 19, de 28 de maio de 2009 (2009d). *Mecanismos de controle e informação da qualidade orgânica*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-19-de-28-de-maio-de-2009-mecanismos-de-controle-e-formas-de-organizacao.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Uma comparação entre a agricultura convencional e orgânica. *EcoCâmara*, Nov. 2009. (2009e) Disponivel em http://www2.camara.leg.br/a-camara/programas-institucionais/meio-ambiente/ecocamara/o-ecocamara/noticias/uma-comparacao-entre-a-agricultura-convencional-e. Acesso em 20 de junho de 2016.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 24, de 01 de junho de 2011 (2011a). *Aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia permitidos no processamento de produtos de origem vegetal e animal orgânicos*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-24-de-01-de-junho-de-2011-processamento.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa interministerial nº 28, de 08 de junho de 2011 (2011b). *Normas Técnicas para os Sistemas Orgânicos de Produção Aquícola*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-interministerial-no-28-de-08-de-junho-de-2011-producao-de-organismos-aquaticos.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 02 de agosto de 2011 (2011c). *Regulamento Técnico para a Produção de Cogumelos Comestíveis em Sistemas Orgânicos de Produção*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugu

es/instrucao-normativa-no-37-de-02-de-agosto-de-2011-cogumelos-comestiveis.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38, de 02 de agosto de 2011 (2011d). *Regulamento Técnico para a Produção de Sementes e Mudas em Sistemas Orgânicos de Produção*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-38-de-02-de-agosto-de-2011-sementes-e-mudas-organicas.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 06 de outubro de 2011 (2011e). *Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção*. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf/view. Acesso em 3 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. *Novo guia alimentar: Ministério da Saúde recomenda consumo de alimentos frescos.* Fev. 2014. Disponível em: http://portalms.saude.gov.br/noticias/683-sas-noticias/9684-ministerio-da-saude-recomenda-consumo-de-alimentos-frescos. Acesso em 13 de junho de 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. *Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil*. Mai. 2017. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf. Acesso em 10 de julho de 2017.

CAC/RCP 53. Codex Alimentarius Comission. *Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables*. p. 1–27. 2003. Disponível em: www.fao.org/input/download/standards/.../CXP_053e_2013.pdf. Acesso em 08 janeiro 2018.

Capalonga, R.; Ramos, R.C.; Both, J.M.C.; Soeiro, M.L.T.; Longaray, S.M.; Haas, S.; Tondo, E.C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. The *Journal of Infection in Developing Countries*, v.8, n.7, p.811-817, 2014.

Carrasco, E.; Morales-Rueda, A.; García-Gimeno, R. M. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, v.45, n.2, p.545–556, 2012.

Center for Disease Control (CDC). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 2006, publicado no *Morbidity and Mortality Weekly Report* em 12 de junho de 2009. Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5822a1.htm. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Center for Disease Control (CDC). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 2007, publicado no *Morbidity and Mortality Weekly Report* em 13 de agosto de 2010. Disponível em:

https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5931a1.htm?s_cid=mm5931a1_w. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Center for Disease Control (CDC). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 2008, publicado no *Morbidity and Mortality Weekly Report* em 9 de setembro de 2011. Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035a3_w. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Center for Disease Control (CDC). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 2009-2010, publicado no *Morbidity and Mortality Weekly Report* em 25 de janeiro de 2013. Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6203a1.htm?s_cid=mm6203a1_w. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2011. *Annual Report*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014. Disponível em: https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2011-508c.pdf. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2012. *Annual Report*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014. Disponível em: https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2012-508c.pdf. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2013. *Annual Report*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2015. Disponível em: https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2014. *Annual Report*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2016. Disponível em: https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-outbreaks-annual-report-2014-508.pdf. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2015. *Annual Report*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2017. Disponível em: https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/2015FoodBorneOutbreaks_508.pdf. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC*). Multistate Outbreak of Salmonella Infections Linked to Imported Maradol Papayas*. 3 de novembro de 2017. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/kiambu-07-17/index.html. Acesso em 08 de agosto de 2017.

Ceuppens, S.; Hessel, C. T.; Rodrigues, R.Q.; Bartz, S.; Tondo, E.C.; Uyttendaele, M. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v.181, p.67–76, 2014.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. *Relatório por culturas do sistema ASPA/AGROGEO – ano de 2015*. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: http://www.emater.rj.gov.br/images/CULT_2015.htm. Acesso em 01 de junho de 2017.

Finten, G.; Agüero, M. V.; Jagus, R. J. Citric acid as alternative to sodium hypochlorite for washing and disinfection of experimentally-infected spinach leaves. *LWT - Food Science and Technology*, V. 82, P. 318–325, 2017.

Forsythe, S.J. Infecções e intoxicações de origem alimentar. In: Forsythe, S.J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, cap. 1, p. 19-81.

Franz, E.; Diepeningen, A. D. Van; Vos, O. J. De; Bruggen, A. H. C. Van. Effects of Cattle Feeding Regimen and Soil Management Type on the Fate of Escherichia coli O157 : H7 and Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Manure , Manure-Amended Soil , and Lettuce Effects of Cattle Feeding Regimen and Soil Management Type on th. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.10, p.6165.6174, 2005.

Gil, M. I.; Selma, M. V.; López-Gálvez, F.; Allende, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p.37–45, 2009.

Gómez-López, V. M.; Lannoo, A. S., Gil, M. I.; Allende, A. Minimum free chlorine residual level required for the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and trihalomethane generation during dynamic washing of fresh-cut spinach. *Food Control*, v. 42, p.132–138, 2014.

Goodburn, C.; Wallace, C. A. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*, v.32, n.2, p.418–427, 2013.

Holt, J.G.; Sneath, P.H.A.; Satey, J.T.; Williams, S.T. Groups within the four major categories of bacteria. In: Holt, J.G. et al. *Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins, p.175- 189, 1994.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, *Coordenação de Trabalho e Rendimento*. - Rio de Janeiro : IBGE, 2011.

IFOAM - International Federation of Organic Agriculture Movements. *The Principles of Organic Agriculture*. Bonn, Germany:Preamble. IFOAM; 2005. Disponível em http://www.ifoam.bio/en/organic-landmarks/principles-organic-agriculture. Acesso em 17 de agosto de 2017.

Inatsu, Y.; Weerakkody, K.; Baru, M.L.; Hosotani, Y.; Nakamura, N.; Kawasaki, S. The efficacy of combined (NaClO and organic acids) washing treatmentes in

controlling *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and spoilage bacteria on shredded cabbage and bean sprout. *LWT – Food Science and Technology*, v.85, p.1-8, 2017.

IPD. Instituto de Promoção do Desenvolvimento. Pesquisa – *O mercado brasileiro de produtos orgânicos*. Disponível em http://www.ipd.org.br/upload/tiny_mce/Pesquisa_de_Mercado_Interno_de_Produtos_Organicos.pdf. Acesso em 15 de junho de 2017.

Jay, J. M. Produtos de frutas e vegetais: inteiros, recém-cortados e fermentados. In: JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª ed., 2005, Porto Alegre: Artmed, cap. 8, p.151-178.

Jay, J. M. Gastroenterites de origem alimentar causadas por Salmonella e Shigella. In: JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª ed., 2005, Porto Alegre: Artmed, cap. 26, p.543-561.

Jensen, D.A.; Friedrich, L.M.; Harris, L.J.; Danyluk, M.D.; Schaffner, D.W. Cross contamination of *Escherichia coli* O157:H7 between lettuce and wash water during home-scale washing. *Food Microbiology*, v. 45, p.428-433, 2015.

Lee, K. M.; Runyon, M.; Herrman, T. J.; Phillips, R.; Hsieh, J. Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, v.47, p.264–276, 2015.

Levin, R.E. Molecular Techniques for Detecting, Quantifying, and Subspecies Typing of Foodborne Pathogenic Bacteria. In: Levin, R.E. *Rapid detection and characterization of foodborne pathogens by molecular techniques*. Boca Raton: CRC Press, 2010, cap. 1, p. 1-28.

Lins, P. Detection of Salmonella spp. in spices and herbs. *Food Control*, v.83, p.1–8, 2017.

Lues, J.F.R.; Theron, M.M. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne Listeria monocytogenes strains in vitro. *Foodborne pathogens and disease*, v.9, n.12, p.1126-1129, 2012.

Luo, Y.; Nou, X.; Yang, Y.; Alegre, I.; Turner, E.; Feng, H.; Abadias, M; Conway, W. Determination of Free Chlorine Concentrations Needed To Prevent *Escherichia coli* O157:H7 Cross-Contamination during Fresh-Cut Produce Wash. *Journal of Food Protection*, v. 74, n.3, p.352–358, 2011.

Madeira, N.R.; Reifschneider, F.J.B.; Giordano, L.B. 2008. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. *Horticultura Brasileira* 26: 428-432.

Maffei, D.F.; Alvarenga, V.O.; Sant'Ana, A.S.; Franco, B.D.G.M. Assessing the effect of washing practices employed in Brazilian processing plants on the quality of ready-to-eat vegetables. *LWT – Food Science and Technology*, v.69, p.474-481, 2016.

Marine, S. C.; Pagadala, S.; Wang, F.; Pahl, D. M.; Melendez, M. V.; Kline, W. L.; Oni, R.A.; Walsh, C.S.; Everts, K.L.; Buchanan, R.L.; Micallef, S. A. The growing season, but not the farming system, is a food safety risk determinant for leafy greens in the Mid-Atlantic Region of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v.8, p.2395–2407, 2015.

Massaguer, P.R. Desinfetantes utilizados na indústria de alimentos. In: Massaguer, P.R. *Microbiologia dos processos alimentares*. 2005, São Paulo: Livraria Varela, cap. 14, p. 191-196.

Niguma, N.H.; Pelayo, J.S.; Olveira, T.C.R.M. Microbiological evaluation of lettuce produced by conventional and organic systems in farms of Londrina, PR. *Ciências Agrárias*, v.38, n.1, p.175-183, 2017.

Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loopp-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, v.28, p.63i-63vii, 2000.

Park, S. H.; Choi, M. R.; Park, J. W.; Park, K. H.; Chung, M. S.; Ryu, S.;Kang, D. H. Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. *Journal of Food Science*, v. *76, n.*6, p.293-298, 2011.

Park, S.H.; Aydin, M.; Khatiwara, A.; Dolan, M.C.; Gilmore, D.F.; Bouldin, J.L.; Ahn, S.; Ricke, S.C. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiology*, v.38, p.250-262, 2014.

Pérez-Rodriguez, F.; Saiz-Abajo, M.J.; Garcia-Gimeno, R.M.; Moreno, A.; González, D.; Vitas, A.I. Quantative assessment of the *Salmonella* distribution of fresh-cut leafy vegetables due to cross-contamination occured in an industrial process simulated at laboratory scale. *International Journal of Food Microbiology*, v.184, p.86-91, 2014.

Prado-Silva, L.; Cadavez, V.; Gonzales-Barron, U.; Rezende, A.C.B.; Sant'Ana, A.S. Meta-analysis of the effects of sanitizing treatments on *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* inactivation in fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, v.81, p.8008-8021, 2015.

Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual de Saúde. Portaria Nº 90, de 14 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 [do] Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, terça-feira, 14 de fevereiro de 2017.

Rodrigues, R.Q.; Loiko, M. R.; de Paula, C.M.D.; Hessel, C. T.; Jacxsens, L.; Uyttendaele, M.; Bender, R.J.; Tondo, E. C. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control*, v.42, p.152–164, 2014.

Sagong, H. G.; Lee, S. Y.; Chang, P. S.; Heu, S.; Ryu, S.; Choi, Y. J.; Kang, D. H. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, v.145, n.1, p.287–292, 2011.

Sant'Ana, A. S.; Landgraf, M.; Destro, M. T.; Franco, B.D.G.M. Prevalence and counts of Salmonella spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. *Food Microbiology*, v.28, n.6, p.1235–1237, 2011.

Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F. J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M. A.; Roy, S. L., Jones, J.L.; Griffin, P. M. Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, v.17, n.1, 7–15, 2011.

Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Taniwaki, M. H.; Santos, R. F. S.; Gomes, R. A. R. *Salmonella*. In: Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Taniwaki, M. H.; Santos, R. F. S.; Gomes, R. A. R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.* São Paulo: Varela, 2010, cap. 19, p. 287-319.

Silva, E.B.; Cardoso, F.T.; Souza, G.G.; Almeid, A. Perfil sócio econômicos de consumidores de produtos orgânicos. *Revista Verde*, v.8, n.1, p.83-89, 2013.

Turra, C.; Nielsen, F.A.G.; Vian, C.E.F.; Moreira, C.F.; Ferrarezi, A.C. The Brazilian consumer's profile and perceptions of organic foods: a review. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, v.4, n.11, p.775-783, 2015.

WHO. World Health Organization. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. *World Health Organization*, 2008. Disponível em:<http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf> Acesso em 10 de julho de 2017.

Willer, H.; Lernoud, J. *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends*. FiBL & IFOAM – Organics International (2017): Frich and Bonn, 2017. Páginas 35-77.

Yuri, J.E.; Mota, J.H.; Resende, G.M.; Souza, R.J. Nutrição e adubação da cultura da alface. IN: Prado, R.M.; Cecílio Filho, A.B. *Nutrição e adubação de hortaliças*. Jaboticabal: FCAV/CAPES, 2016, cap. 21, p.559-575.

Zhang, J.; Yang, H. Effects of potential organic compatible sanitisers on organic and conventional fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa* Var. Crispa L). *Food Control*, v. 72, p.20–26, 2017.