

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**SANITIZAÇÃO PARA ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA
EM COMPARAÇÃO AO HIPOCLORITO DE SÓDIO**

MARA LIGIA BIAZOTTO BACHELLI

CAMPINAS
FEVEREIRO DE 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**SANITIZAÇÃO PARA ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA
EM COMPARAÇÃO AO HIPOCLORITO DE SÓDIO**

Dissertação submetido à banca
examinadora para obtenção do
título de Mestre em Engenharia
Agrícola na área de concentração
em Tecnologia Pós-colheita.

MARA LIGIA BIAZOTTO BACHELLI

Orientador: Prof. Dr. Benedito Carlos Benedetti

CAMPINAS
FEVEREIRO DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

B123s Bachelli, Mara Ligia Biazotto
Sanitização para alface minimamente processada em
comparação ao hipoclorito de sódio / Mara Ligia
Biazotto Bachelli. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Benedito Carlos Benedetti.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Alimentos - Embalagens. 2. Alimentos - Vida útil.
3. Alimentos - Microbiologia. 4. Alimento seguro. 5.
Alface. I. Benedetti, Benedito Carlos. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Agrícola. III. Título.

Título em Inglês: Minimally processed lettuce sanitation in comparison to
sodium hypochlorite

Palavras-chave em Inglês: Food packaging, Food shelf life, Food
microbiology, Food safety, Lettuce

Área de concentração: Tecnologia Pós-colheita

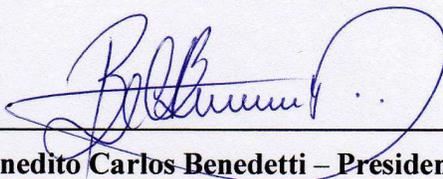
Titulação: Mestre em Engenharia Agrícola

Banca examinadora: Sylvio Luis Honório, Neliane Ferraz de Arruda Silveira

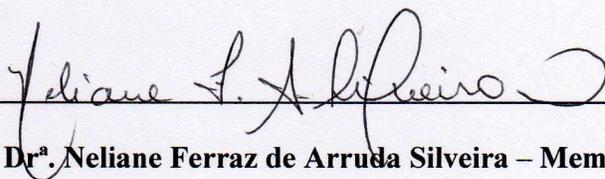
Data da defesa: 05/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Agrícola

Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Mara Ligia Biazotto Bachelli**, aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de fevereiro de 2010, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

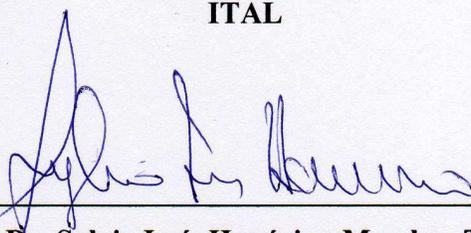


**Prof. Dr. Benedito Carlos Benedetti – Presidente e Orientador
Feagri/Unicamp**



Dr.ª Neliane Ferraz de Arruda Silveira – Membro Titular

ITAL



**Prof. Dr. Sylvio Luís Honório - Membro Titular
Feagri/Unicamp**

“Aprender é a única coisa de que a mente não se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Á Deus pela sua infinita misericórdia.

Aos meus pais, Marcilio e Zenaide, por todo ensinamento, carinho e exemplo.

Ao meu querido esposo, pelo amor e incentivo na realização dos meus sonhos.

DEDICO

A minha família pela importância em minha vida.

A grande surpresa que Deus preparou... uma nova vida em nossa vida!!!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Engenharia Agrícola – UNICAMP, pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Benedito Carlos Benedetti, pela orientação segura e competente, acima de tudo pela confiança depositada em mim ao longo destes anos.

A pré-banca e banca pelas sugestões, Professor Dr. Sylvio Luís Honório e Dr^a. Neliane Ferraz de Arruda Silveira... meus agradecimentos.

A toda a minha família, que tanto amo, representada pelas minhas irmãs, Iara e Érica pelas vezes que deram força e paciência, pela alegria que colocaram em minha vida com a chegada das minhas sobrinhas e agora do meu pequeno sobrinho.

Um agradecimento especial a família Bachelli, Sr. Valdomiro e dona Antonia, sem a ajuda de vocês seria muito mais difícil encarar esse desafio.

Aos técnicos do Laboratório Pós-Colheita: Rosália e Francisco, pela dedicação e amizade, a Rosa Helena, profissional de pesquisa do Laboratório Pós-Colheita, pelas palavras de incentivo, ensinamentos e ajuda incondicional na elaboração dos experimentos.

Aos funcionários da FEAGRI pelo apoio e dedicação ao trabalho, em especial ao Sr. Clóvis e José de Alencar.

Aos queridos amigos da pós-graduação: Conan, Carmel, Gabriel Bueno, Rívia, Stela e Vânia e todos os outros que convivi por todo esse tempo. Vocês são amigos que levo no coração...

Em especial quero agradecer minha amiga e companheira de todas as horas pelos ensinamentos, pelas palavras de carinho e incentivo, com certeza meus dias não seriam tão alegres se não fosse sua presença. Essa foi mais uma das boas surpresas que a vida me preparou: conhecer você Rívia!

A minha eterna professora e querida amiga, a quem devo parte do que sou hoje como profissional: Kátia Rodrigues.

Aos amigos do SND do Hospital e Maternidade Celso Pierro (PUC) pelo apoio, carinho e respeito. Aos docentes e colegas da Faculdade de Nutrição (PUC-Campinas) pelo incentivo.

Aos meus ajudantes de final de semana e férias: Juliana, Leonardo, Matheus, Beto, Rita e Amanda, sem vocês minhas tardes seriam intermináveis.

Ao Ricardo Mendonça pela confiança no nosso trabalho e doação da matéria prima, primordial para execução deste experimento.

À empresa Sabará e Panozon pela doação de produtos e equipamento indispensável para a execução deste trabalho, em especial pela disponibilidade do Sr. Márcio em me ajudar na 1ª fase e ao Sr. Pacheco pelas orientações.

A Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Agrícola, pela acolhida, profissionalismo, apoio e amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	4
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. HIPÓTESE.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	5
4.2 BOAS PRÁTICAS DE PRODUÇÃO (BPP).....	6
4.3 PROCESSAMENTO MÍNIMO E BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF)	8
4.4 SANITIZAÇÃO.....	10
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 MATÉRIA-PRIMA	15
5.2 PROCESSAMENTO MÍNIMO.....	15
5.3 INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	17
5.3.1- 1ª Etapa: Definição da concentração de dióxido de cloro, ácido peracético e água ozonizada.....	17
5.3.2- 2ª Etapa: Comparação dos diferentes sanitizantes	19
5.4 ANÁLISES REALIZADAS	20
5.4.1 Avaliação microbiológica	20
5.5.2 Análise Sensorial.....	22
5.5.3 Análise Físico-Química.....	22
5.5.4 Determinação da composição gasosa no interior das embalagens com o tempo de armazenamento refrigerado (2°C+1°C).....	24
5.5.5 Delineamento experimental e Análise estatística.....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1- 1ª ETAPA	25

6.2- 2ª ETAPA.....	30
6.2.1 Avaliação da Qualidade Microbiológica da alface minimamente processada.....	30
6.2.2 Avaliação da qualidade fisico-química da alface minimamente processada	37
6.2.3 Avaliação da cor da alface minimamente processada.....	41
6.2.4 Avaliação da composição gasosa no interior das embalagens de alface minimamente processada	49
6.2.5 Análise Sensorial.....	51
7. CONCLUSÕES.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais áreas cultivadas no estado de São Paulo (Fonte: CATI, 2007)	6
Figura 2. Estrutura provável para o ácido peracético e seus subprodutos	13
Figura 3. Formação do Ozônio	14
Figura 4. Fluxograma do processamento mínimo de alface americana, cultivar <i>Lorca</i> , com adaptações. (Fonte: DAREZZO, 2004; RINALDI, 2005; CHITARRA e CHITARRA, 2007)16	
Figura 5. Equipamento gerador de água ozonizada.....	18
Figura 6. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com hipoclorito de sódio (T1), armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias. Julho de 2009.....	44
Figura 7. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com dióxido de cloro (T2), armazenadas 2°C +1°C por 12 dias. Julho de 2009.	45
Figura 8. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com ácido peracético (T3), armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias. Julho de 2009.	46
Figura 9. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com água ozonizada (T4), armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias. Julho de 2009.	47
Figura 10. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com água potável (T5), armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias. Julho de 2009.	48
Figura 11. Variação da concentração de O ₂ e CO ₂ no interior da embalagem de alface minimamente processada submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias. Julho, 2009.....	49
Figura 12. Variação da concentração de CO ₂ no interior da embalagem de alface processada minimamente submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias. Outubro, 2009.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios da composição nutricional da alface americana (em 100 g).....	6
Tabela 2. População microbiana em alface minimamente processada submetida a sanitização com diferentes concentrações de dióxido de cloro. Valores médios de 3 repetições.....	25
Tabela 3. Análise de variância para pH e sólidos solúveis (°Brix) em diferentes concentrações de dióxido de cloro.	26
Tabela 4. População microbiana em alface minimamente processada submetida a diferentes concentrações de ácido peracético. Valores médios de 3 repetições.....	27
Tabela 5. Análise de variância para pH e sólidos solúveis (°Brix) em diferentes concentrações de ácido peracético.	28
Tabela 6. População microbiana em alface minimamente processada submetida a diferentes concentrações de ozônio. Valores médios de 3 repetições.....	29
Tabela 7. Análise de variância para pH e sólidos solúveis (°Brix) em diferentes concentrações de água ozonizada.....	30
Tabela 8. Contagem de coliformes totais (UFC g ⁻¹) em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias em julho e outubro/2009.....	31
Tabela 9. Contagem de total de microrganismos aeróbios mesófilos (UFC g ⁻¹) em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias em julho e outubro/2009.	33
Tabela 10. Contagem total de aeróbios psicrotróficos em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias em julho e outubro/2009.....	34
Tabela 11. Contagem de bolores e leveduras (UFC g ⁻¹) em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias em julho e outubro/2009.....	35
Tabela 12. Variação das médias atribuídas aos parâmetros ácido ascórbico, acidez titulável, pH e sólidos solúveis obtidos na alface americana minimamente processada, submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias em julho/2009.	38

Tabela 13. Variação das médias atribuídas aos parâmetros ácido ascórbico, acidez titulável, pH e sólidos solúveis obtidos na alface americana minimamente processada, submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias em outubro/2009.	39
Tabela 14. Valores médios de a^* para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C +1°C por 12 dias em outubro/2009.....	41
Tabela 15. Valores médios de L^* para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C+1°C por 12 dias em outubro/2009.....	42
Tabela 16. Valores médios de Croma* para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C+1°C por 12 dias em outubro/2009.....	42
Tabela 17. Valores médios de hue^* para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C+1°C por 12 dias em outubro/2009.....	43
Tabela 18. Valores médios dos atributos sensoriais da alface minimamente processada, sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C +1°C. Julho, 2009.	52

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os compostos dióxido de cloro, ácido peracético e ozônio, como agentes sanitizantes alternativos para alface minimamente processada em comparação ao hipoclorito de sódio. O mesmo foi conduzido em duas etapas, sendo adotada em ambas a mesma metodologia para o processamento mínimo, que consistiu em seleção, pré-enxágüe, corte, sanitização e enxágüe, centrifugação e embalagem. Na primeira etapa definiram-se as concentrações mais adequadas de dióxido de sódio, ácido peracético e água ozonizada, para serem utilizadas na segunda etapa. Nesta etapa, comparou-se os três tratamentos com o sanitizante hipoclorito de sódio na concentração de 150 mg L^{-1} e imersão por 15 min., além do tratamento com água potável (controle). Na segunda etapa, dois ensaios foram realizados, um em julho/2009 e outro em outubro/2009, e em ambos a alface minimamente processada foi armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ e as amostras foram submetidas a análises microbiológicas, físico-químicas e sensorial, no dia zero (antes e após sanitização) e aos 3, 6, 9 e 12 dias, além do monitoramento da composição gasosa no interior das embalagens. Na primeira etapa, os melhores resultados foram: solução de dióxido de cloro na concentração de 60 mg L^{-1} por 10 min. de imersão; solução de ácido peracético com 100 mg L^{-1} por 15 min. de imersão e água ozonizada na concentração de ozônio de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ com tempo de imersão de 1 min. Na segunda etapa, todos os tratamentos de sanitização reduziram a contagem microbiana em comparação com a matéria-prima antes do processamento. A lavagem com água potável foi capaz de reduzir 1 ciclo logarítmico na contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, bolores e leveduras no primeiro ensaio, mas não foi suficiente para a redução de coliformes totais; porém, o mesmo não aconteceu no segundo ensaio. O dióxido de cloro foi o tratamento mais eficiente nos dois ensaios para a redução de coliformes totais passando de $>1,1 \times 10^3 \text{ UFC g}^{-1}$ (antes do processo) para $<3,0 \text{ UFC g}^{-1}$ (após sanitização). O ácido peracético foi o sanitizante que apresentou a maior redução para mesófilos e psicrotróficos no dia zero em relação ao produto antes do processamento, chegando a reduzir até 5 ciclos logarítmicos; porém, na avaliação sensorial no 6º dia o produto foi rejeitado, por apresentar manchas nas folhas e sua impressão global da aparência receber uma nota média muito baixa (3,76). O tratamento com hipoclorito de sódio recebeu a segunda maior média (7,86). O uso de água ozonizada não se mostrou eficiente na redução da carga

microbiana, necessitando outros estudos em concentrações diferentes. De acordo com as análises microbiológicas a alface minimamente processada apresentou ausência de *E.coli* e de *Salmonella* spp. em todas as amostras. Tomando como base que níveis populacionais maiores que 10^5 UFC g⁻¹ já são indicadores de final de vida de prateleira, pode-se concluir que, sob refrigeração a 2°C, a durabilidade da alface minimamente processada foi de seis dias para os tratamentos utilizados.

Palavras Chave: alimento seguro; dióxido de cloro; ácido peracético; ozônio; processamento mínimo; população microbiana.

ABSTRACT

MINIMALLY PROCESSED LETTUCE SANITATION IN COMPARISON TO SODIUM HYPOCHLORITE

This study aimed to evaluate the compounds chlorine dioxide, peracetic acid and ozone as alternative sanitizers for minimally processed lettuce as compared to sodium hypochlorite. The study was conducted in two stages, in both adopted the same methodology for the minimal processing, consisting of selection, pre-rinse, cut, sanitize and rinse, centrifugation and packaging. The first stage outlined the most appropriate concentrations of sodium dioxide, peracetic acid and ozonated water to be used in the second stage. In this step, it was compared the three treatments with sodium hypochlorite sanitizer at a concentration of 150 mg L^{-1} and immersion for 15 min. In addition to treatment with water (control). In the second stage, two experiments were conducted, one in July/2009 and another in October/2009, and in both the minimally processed lettuce was stored at $2 \pm 1^\circ\text{C}$ and the samples were subjected to microbiological, physicochemical and sensory analysis, in day zero (before and after sanitization) and at 3, 6, 9 and 12 days, in addition to monitoring the gas composition inside the package. In the first stage, the best results were: solution of chlorine dioxide at 60 mg L^{-1} for 10 min immersion; peracetic acid solution with 100 mg L^{-1} for 15 min immersion and ozonated water at 1.2 mg L^{-1} for 1 min immersion. In the second step, all sanitation treatments reduced the microbial count in comparison with the raw material before processing. Rinsing with water was able to reduce 1 log cycle in the total count of aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria, yeasts and molds in the first test, but was not sufficient to reduce total coliform, but it did not happen in the second test. Chlorine dioxide was the most effective treatment in two trials to reduce total coliform passing of $> 1.1 \times 10^3 \text{ CFU g}^{-1}$ (before trial) to $< 3.0 \text{ CFU g}^{-1}$ (after sanitization). Peracetic acid was the sanitizer that showed the greatest reduction in bacteria mesophilic and psychrotrophic bacteria on day zero for the product before processing to reduce reaching 5 log cycles, but the sensory evaluation on the 6th day the product was rejected by presenting spots on the leaves, and overall bad aspect, which caused to receive a very low average score (3.76). Treatment with sodium hypochlorite received the second highest average (7.86). The use of ozonated water was not efficient in

reducing microbial load, requiring further studies in different concentrations. According to the microbiological analysis, minimally processed lettuce showed absence of *E.coli* and *Salmonella* spp. in all samples. Based on that population levels greater than 10^5 UFC g^{-1} are already indicators of the end of shelf life, it can be concluded that, under refrigeration at 2°C, the durability of minimally processed lettuce was six days for all treatments.

KEYWORDS: food safety, chlorine dioxide; peracetic acid; ozone; minimal processing; microbial load.

1. INTRODUÇÃO

A alface é uma hortaliça cuja utilização como alimento já é conhecida há milênios na bacia do mediterrâneo, sendo muito apreciada pelos gregos exclusivamente na forma de salada crua. No Brasil, é a hortaliça consumida crua mais comercializada, sendo amplamente utilizada na confecção de lanches, saladas e decorações de pratos. Ela apresenta sabor agradável e refrescante, sendo rica em sais minerais e vitaminas e, ainda, apresenta efeito calmante, laxativo e diurético. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o baixo consumo de hortofrutícolas é responsável por 19% dos cânceres gastrointestinais, 31% da doença cardiovascular isquêmica e 11% dos enfartes do miocárdio (FAO, 2005). Sabe-se, ainda, que o baixo consumo destes alimentos está entre os 10 fatores de risco para a morte prematura. Assim, a demanda por dietas mais saudáveis, com alimentos frescos, tem sido atendida pelo mercado de hortifrutícolas que está em franco crescimento.

Uma parcela desse mercado é atendida pelos produtos minimamente processados. O consumo desses produtos tem tido considerável aumento nos últimos anos, por sua praticidade, segurança e conveniência. Eles podem ser definidos como frutas ou hortaliças, ou a combinação destas, que tenham sido fisicamente alteradas, mas que permaneçam em estado fresco, com qualidade e segurança para consumo, por períodos prolongados de tempo, e sem alteração da qualidade nutricional (CHITARRA, 2000; MORETTI, 2007).

Os produtos minimamente processados são mais perecíveis do que os produtos *in natura* que lhes dão origem, e a injúria nos tecidos, em função da manipulação e cortes, pode diminuir a qualidade e seu tempo de vida útil, por acelerar o processo de respiração. Além disso, o manuseio favorece a contaminação por microrganismos e a liberação de exsudado celular disponibiliza nutrientes para a atividade microbiana. Portanto, a segurança e a qualidade microbiológica desses produtos precisam ser garantidas, associada à manutenção das qualidades sensorial e nutricional (CANTWELL, 2002; VANETTI, 2004).

A preocupação com riscos de natureza microbiológica torna-se acentuada, uma vez que, em sua maioria, os minimamente processados são consumidos crus, na forma de saladas e o manuseio humano em algumas operações de processamento mínimo, inclusas as etapas de lavagem, secagem, seleção e acondicionamento, aumentam o risco de contaminação por microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Diversas pesquisas

evidenciaram a contaminação de produtos consumidos crus em todo o país, acentuando a necessidade da ação da vigilância sanitária em produtos e estabelecimentos alimentícios evitando assim surtos de toxinfecções alimentares (OLIVEIRA *et al.*, 2006; PANZA *et al.*, 2006; TANCREDI *et al.*, 2005; TAKAYANAGUI *et al.*, 2001).

No Brasil, data de 1945 o conhecimento sobre a contaminação fecal em hortaliças como a alface, quando pesquisadores detectaram presença de *Escherichia coli* em 29,3% de hortaliças diversas na cidade de São Paulo. Desde então, até os dias atuais, alimentos como as folhosas, salsinhas, sucos e tomates são incriminados como causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) em todo o mundo (BERBARI *et al.*, 2001; BEUCHAT, 2002). Pretendendo controlar a produção e comercialização e diminuir os casos de internações por DTA's, tornou-se marcante no país a Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, visando garantir padrões microbiológicos para produtos consumidos crus (BRASIL, 2001). Embora não haja legislação para bactérias deteriorantes como as psicrotólicas, bolores, leveduras e mesófilas, tem sido preconizado que contagens acima de 10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de produto são indesejáveis devido ao potencial risco de estarem estragadas, perda das características organolépticas e comprometimento da qualidade do alimento (VITTI *et al.*, 2004)

A sanitização com produtos a base de cloro é amplamente recomendada para retardar ou reduzir o crescimento microbiológico em vegetais minimamente processados. Por questões econômicas, os compostos clorados geralmente são os mais utilizados, embora a formação de trihalometanos, compostos cancerígenos, a partir desse sanitizante, constitua-se num inconveniente. Levantamentos epidemiológicos relacionando a concentração dos trihalometanos com a morbidade e as mortalidades por câncer evidenciaram associações positivas em alguns casos de carcinomas. Surge, assim, o interesse por alternativas de desinfecção que possam substituir o cloro, proporcionando outros benefícios, não só de ordem econômica, mas também no aspecto de segurança do alimento (KHORDAGUI e MANCY, 1983; SANTOS, 1989).

Em alguns países, o hipoclorito de sódio vem sendo proibido através de legislações rígidas e a tendência é que essa proibição aconteça em outras localidades, sendo assim, se faz necessária algumas alternativas para a minimização ou substituição do hipoclorito de sódio. A “Food and Drug Administration”, dos Estados Unidos, em seu regulamento 21

C.F.R. § 173.315, aprova o uso, além do hipoclorito de sódio, de dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e ozônio como sanitizantes para frutas e hortaliças frescas e minimamente processadas (RICO *et al.*, 2007).

Assim, este trabalho tem como objetivo estudar o efeito de alguns sanitizantes para alfaces minimamente processadas.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os compostos dióxido de cloro, ácido peracético e ozônio, como agentes sanitizantes alternativos para alface minimamente processada em comparação ao hipoclorito de sódio.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros de eficiência da sanitização comparando-os com o hipoclorito de sódio.
- Mensurar os parâmetros de qualidade da alface minimamente processada, através de análises microbiológicas, físico-químicas, sensorial e composição gasosa.

3. HIPÓTESE

Outros compostos possam ser utilizados como alternativa ao hipoclorito de sódio na higienização de alface minimamente processada.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Considerações Gerais

Originária da Europa e da Ásia, a alface, *Lactuca sativa L.*, pertence à família Asteracea. Sua utilização como alimento já é conhecida há milênios na bacia do mediterrâneo, sendo muito apreciada pelos gregos exclusivamente na forma de salada crua (MENEZES *et al.*, 2005; OKURA *et al.*, 2006). A alface, é a hortaliça consumida crua, mais comercializada em todo o Brasil. Cada paulistano consome quase dois quilos por ano, sendo que 40% dos seus gastos totais com verduras são destinados à compra da alface (CEASA-CAMPINAS, 2006).

O vegetal é amplamente utilizado na confecção de lanches, saladas e decorações de pratos, sendo que a folhosa foi introduzida no país pelos portugueses no século XVI se difundindo com facilidade por apresentar sabor agradável e refrescante, ser fonte de sais minerais e vitaminas, e ainda apresentar efeito calmante, laxativo e diurético. (EMBRAPA/HORTALIÇAS, 2006; MENEZES *et al.*, 2005; OKURA *et al.*, 2006). Na compra da hortaliça, o cliente deve optar pelas que apresentem as folhas com aspecto de produto fresco, ou seja, devem ser brilhantes, firmes, sem áreas escuras, sendo cor e defeitos os critérios de qualidade mais visíveis. Ao escolher a alface, deve-se evitar amassá-la ou quebrar as folhas, selecionando-a com cuidado, pelo seu aspecto de textura. Em respeito aos outros consumidores, deve-se evitar pegar em todas as unidades expostas na banca (EMBRAPA/HORTALIÇAS, 2006). Além dos critérios de sabor, aroma e valor nutritivo, outro critério a ser observado, porém menos visível, é o de segurança, que diz respeito à contaminação física, química e biológica.

A composição nutricional da alface contém diversos nutrientes essenciais (Tabela 1) para o bom funcionamento do organismo e a fibra alimentar que é uma substância funcional, indisponível como fonte de energia, mas que possui efeito de redução dos níveis de colesterol sanguíneo e diminui os riscos de desenvolvimento de câncer (ANJO, 2004; TACO, 2006).

Tabela 1. Valores médios da composição nutricional da alface americana (em 100 g)

g fibra alimentar	kcal	% Umidade	µg VitA	mg VitB	mg VitB2	mg VitB6
1,0	9,0	97,2	NA	0,03	Tr	0,04
mg VitC	mg Mn	mg Mg	mg Zn	mg K	mg Na	mg Ca
11,0	0,12	6	0,2	136	7	14
mg Cu	mg P	mg S	mg Fe	g Carboidrato	g Proteínas	g Lipídeos
0,02	19	21	0,3	1,7	0,6	0,1

mg=miligrama; g= grama

Fonte: TACO (2006)

No Estado de São Paulo, a alface ocupa 7.859 hectares, produz 137 mil toneladas/ano e gera mais de 6.000 empregos (CEASA-CAMPINAS, 2002). Os principais municípios fornecedores são: Piedade (18%), Mogi das Cruzes (14%) e Suzano (11%) (EMBRAPA/HORTALIÇAS, 2006).

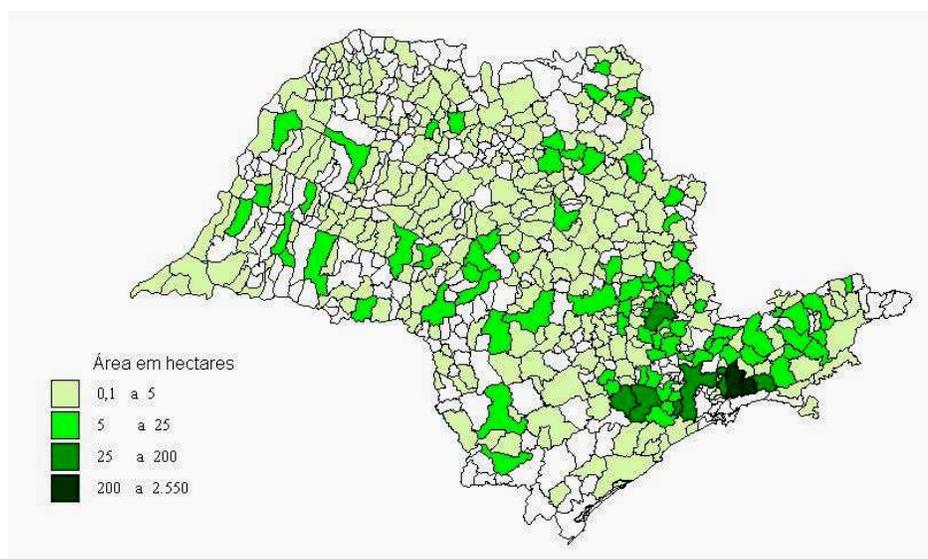


Figura 1. Principais áreas cultivadas no estado de São Paulo (Fonte: CATI, 2007)

4.2 Boas Práticas de Produção (BPP)

A qualidade dos produtos hortícolas é originada no campo e, dependendo desta qualidade, tem-se a determinação da sua vida útil (SIGRIST, 1998). Sendo assim, o cuidado

no setor produtivo torna-se imprescindível e a aplicação de boas práticas agrícolas é fundamental à obtenção de um produto minimamente processado seguro e com qualidade. Aspectos que devem ser observados são as análises periódicas da água de irrigação, por influenciar o grau de contaminação inicial da matéria-prima; a compostagem ou fermentação dos adubos orgânicos, pois determinam a microbiota da matéria-prima; o cultivo sobre plásticos, limitando a contaminação; o respeito ao ‘ponto de colheita’ e o descarte das folhas mais externas (mais contaminadas) em nível de campo; a sanitização freqüente das caixas de colheita, limitando a fonte de inoculo e o transporte rápido e lonado, nas primeiras horas do dia, tomando-se o cuidado de não abafar a matéria-prima.

O ponto de colheita indicado para a alface, sendo um produto não climatérico, corresponde ao máximo desenvolvimento da cabeça, estando às folhas ainda tenras e não havendo nenhum indício de florescimento. A colheita deve ser realizada nas primeiras horas do dia ou no início da noite, visando a redução do calor que o produto traz do campo e, conseqüentemente, limitando a elevação de sua taxa respiratória, a qual acarreta em um metabolismo acelerado. No caso de ser colhida em estágio de maturação avançado, a alface perde seu valor comercial devido ao aumento do teor de látex, provocando o endurecimento das folhas e um acentuado gosto amargo (DAREZZO, 2004; IAC, 2005).

Por se tratar de uma hortaliça tipicamente folhosa, a alface é consumida *in natura*. Frescor e limpeza são as características mais valorizadas pelo consumidor (EMBRAPA/HORTALIÇAS, 2006). No entanto, devido às técnicas inadequadas de manuseio do vegetal após a colheita, especialmente durante as operações de transporte e armazenamento, as perdas acarretam em prejuízos aos produtores e varejistas e também aos consumidores que podem adquirir um produto de qualidade duvidosa (RODRIGUES *et al.*, 1999). A manutenção da qualidade exige uma embalagem que ofereça proteção, boa apresentação, informações sobre o produto, racionalização do transporte e armazenagem e que tenha baixo custo. A alface deverá ser acondicionada em embalagens paletizáveis, limpas e secas. A qualidade do produto e, por conseguinte, seu valor comercial, depende de uma série de características físico-químicas, a começar pela sua maturação no momento da colheita (DAREZZO, 2004).

4.3 Processamento Mínimo e Boas Práticas de Fabricação (BPF)

O processamento mínimo consiste numa tecnologia empregada em frutas e hortaliças com a finalidade de atender a necessidade do mundo moderno de praticidade e redução de perdas e descartes nas residências, além de fornecer aos consumidores produtos de qualidade, prontos para ser consumido cru ou em preparações culinárias, além de facilitar o abastecimento e acessibilidade. Proporciona maiores ganhos aos produtores e comerciantes, agregando valor ao vegetal, em função dos serviços prestados durante a sua modificação (DAREZZO, 2004; OKURA *et al.*, 2006).

Como vantagem aos produtores, destaca-se o melhor preço de venda, podendo agregar valor ao produto, garantir comprador fixo, evitando os riscos de comercialização em centrais de abastecimento, ao mesmo tempo em que reduz as perdas dispondo de melhor aparência, facilitando assim a sua venda, além de ocupar menos espaço diminuindo os gastos com transporte e armazenamento. Para o varejista, em muitos casos, estes produtos superam em volume de vendas os produtos não processados resultando em acréscimo no rendimento de sua empresa, além de oferecer um produto prático e diferenciado. Para o consumidor, a praticidade pode compensar o maior custo devido à redução do desperdício e o aumento do aproveitamento do vegetal comprado. Lembrando, ainda, que lanchonetes e restaurantes economizarão com mão-de-obra, tempo e espaço físico (UFLA, 2006).

A implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de um programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é essencial para o sucesso na comercialização de frutos e hortaliças minimamente processadas, sendo necessários para prevenir e controlar os riscos da contaminação microbiana e manter a qualidade do produto (CHITARRA, 2000). Para as BPF das hortaliças minimamente processadas, em geral, segue-se um fluxograma básico, iniciando-se no campo, com a colheita da matéria-prima, seleção e transporte para o local de processamento, onde ocorre a recepção do produto e a retirada das folhas externas de forma manual; em seguida o produto é encaminhado para as etapas de processamento, quando passa para a área limpa, onde ocorre corte, sanitização, centrifugação, acondicionamento e armazenamento (CHITARRA e CHITARRA, 2007).

Para as etapas do processamento mínimo de hortaliças, se faz necessário o uso de equipamentos de proteção individual, onde são manipulados os alimentos, sendo eles as luvas, gorros, máscaras, aventais e botas (AGUILA *et al.*, 2006; MAISTRO, 2001).

Atualmente, em grandes cidades, a população tem realizado suas refeições a partir de alimentos de fácil preparo ou em estabelecimentos alimentícios, fora de suas residências. Tais hábitos expõem os consumidores a contraírem DTA's, cabendo aos serviços de Vigilância Sanitária diminuir estes riscos (TANCREDI *et al.*, 2005). No Brasil, data de 1945 o conhecimento sobre a contaminação fecal em hortaliças como a alface, que são consumidas cruas, quando pesquisadores detectaram presença de *Escherichia coli* em 29,3% de hortaliças diversas na cidade de São Paulo. Desde então, até os dias atuais, alimentos como as folhosas, salsinhas, sucos e tomates são incriminados como causadores de DTA's em todo o mundo (BERBARI *et al.*, 2001). Pretendendo controlar a produção e comercialização e diminuir os casos de intoxicações por DTA's, tornou-se marcante no país a Resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), visando garantir padrões microbiológicos para produtos consumidos crus (BRASIL, 2001). Embora não haja legislação para bactérias deteriorantes como as mesófilas, psicotróficas, bolores e leveduras, tem sido preconizado que contagens acima de 10^5 UFC g⁻¹ são indesejáveis devido o risco potencial de estarem estragadas, perda das características organolépticas e comprometimento da qualidade do alimento (VITTI, 2004).

A garantia da qualidade dos produtos minimamente processados depende diretamente da contaminação microbiológica inicial da matéria-prima, sendo facilmente influenciada pelas etapas de produção (AGUILA *et al.*, 2006; MAISTRO, 2001). A microbiologia desses produtos é de caráter multifatorial, sendo relevante o pH, atividade de água, nutrientes, procedência, etapas de processamento e condições higiênicas dos manipuladores, equipamentos e ambiente de preparo (PINHEIRO, 2005).

Para a vigilância sanitária, são pesquisados microrganismos indicadores que, quando presentes em alimentos, fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, possível presença de patógenos ao homem, deterioração do alimento, e denuncia a falta de BPF durante o processo e manipulação dos mesmos. Entre os indicadores mais analisados em alimentos estão os aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*.

Em estudos realizados em alfaces, Berbari *et al.* (2001) encontraram 10^6 UFC g^{-1} de coliformes totais, aos 6 dias de armazenamento a 2°C; o produto havia sido sanitizado com água clorada a 70 mg L^{-1} . Em Belém do Pará, Oliveira *et al.* (2006) ao analisarem alface adquiridas em feira-livre encontraram 25% das amostras com valores de coliformes termotolerantes a 45°C (fecais) acima do permitido. Em Ribeirão Preto, 63% das hortaliças comercializadas no município apresentaram as mesmas condições, segundo estudo de Takayanagui *et al.* (2001).

Outros fatores importantes na manutenção da qualidade dos produtos minimamente processados são a temperatura e a embalagem com atmosfera modificada, pois podem interferir na atividade fisiológica, que compreende as atividades metabólica, respiratória e enzimática. A operação de pré-lavagem e lavagem, em água tratada com temperatura variando de 4 a 5°C, pode ser benéfica à conservação desses produtos, pois além de reduzir a taxa respiratória do mesmo, propicia uma desinfecção superficial (MORETTI, 2007). E quando a atmosfera modificada é associada à refrigeração, há substancial redução do crescimento microbiano e mudanças químicas e fisiológicas podem ser retardadas (PIROVANI *et al.*, 1998).

4.4 Sanitização

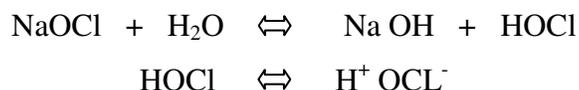
No processamento mínimo de frutas e hortaliças, a etapa de sanitização é fundamental, tendo como objetivo a redução a níveis aceitáveis ou inativação de microrganismos patogênicos, capazes de produzir doenças, e dos microrganismos deteriorantes. Na água, em temperaturas próximas a 21°C, alguns microrganismos podem sobreviver semanas. Já em baixas temperaturas, em alguns casos, a sobrevivência pode chegar a meses. A sobrevivência desses organismos na água não depende só da temperatura, mas também de outros fatores como: pH, turbidez, quantidade de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, população de organismos competidores, resistência dos organismos a substâncias tóxicas e até a habilidade na formação de esporos. Além da espécie e população de organismos, concentração do sanitizante, tempo de contato, característica química e física da água e grau de dispersão do sanitizante na água. A desinfecção eficiente não quer dizer que necessariamente ocorra à destruição completa de todas as formas vivas como na

esterilização, mas sim a redução a níveis seguros da carga microbiana presente (MEYER, 1994).

A sanitização deve ser realizada por meio de procedimentos químicos ou físicos aplicados de forma adequada. A sanitização inadequada, tanto para equipamentos, alimentos e ambiente pode comprometer todo um lote de produto que não poderá ser comercializado. O processo físico de sanitização consiste na utilização de vapor (água quente), raios gama (irradiação), radiação ultravioleta (UV), ozônio (O₃), luz pulsante e outros, ao passo que o processo químico emprega o uso de agentes químicos como o cloro, ácidos orgânicos, agentes umectantes, quaternário de amônia e compostos iodados. Por questões econômicas, os compostos clorados geralmente são os mais utilizados (BARI *et al.*, 2003; BERBARI *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2006; VIEITES *et al.*, 2005).

Os produtos clorados, como os sais de hipoclorito, constituem o grupo de compostos sanificantes mais utilizado nas indústrias de alimentos, por ser eficiente e de baixo custo. No Brasil, o hipoclorito de sódio é o único agente sanitizante permitido pela legislação e vem sendo utilizado nos produtos minimamente processados para manter sua qualidade microbiológica. Estudos realizados com alface, em Campinas-SP, mostraram que a imersão, por 15 minutos, em solução contendo 70 mg L⁻¹ de cloro confere a alface minimamente processada uma vida-útil de seis dias, armazenadas a temperatura de 2°C e em solução contendo 100 a 130 mg L⁻¹, vida-útil de nove dias nas mesmas condições de armazenamento (BERBARI *et al.*, 2001). Entretanto, nos últimos anos tem existido certa preocupação quanto ao uso do hipoclorito de sódio e dos demais sais de cloro considerados precursores na formação de cloraminas orgânicas, compostos de alto potencial carcinogênico, despertando interesse por outros compostos (KIM *et al.*, 1999). Segundo Condie (1986), desde 1974 que a cloração de águas para o tratamento primário através do cloro gasoso vem sendo questionada nos Estados Unidos, quando foram detectados valores acima dos permissíveis, que é de 100 µg L⁻¹ de trihalometanos para a saúde humana em águas para abastecimento público. No Brasil, o teor máximo em água potável também é de 100 µg L⁻¹ de trihalometanos, a partir da promulgação da Portaria nº36, de 19/01/1990, que passou a vigorar a partir de 23/01/92, mantida pela Portaria nº1469 de 29/12/2000 (MEYER, 1994; BRASIL, 2000).

O hipoclorito de sódio é eficaz em reduzir a população de bactérias, fungos, vírus e nematóides e, em água, origina hidróxido de sódio (NaOH) e ácido hipocloroso (HCl). O agente germicida refere-se ao ácido hipocloroso, que se dissocia em H⁺ e no íon OCl⁻.



Comprovadamente, o ácido hipocloroso exerce maior ação desinfetante que o íon hipoclorito (OCl⁻), o que se explica pela maior facilidade de penetração do ácido através da parede celular, por ser uma molécula pequena e neutra. O íon hipoclorito por sua vez tem maior dificuldade em atravessar a parede celular e atingir o sistema enzimático em função da sua carga negativa. Portanto, é possível que a maior dificuldade na eliminação das formas esporuladas se deva à resistência a penetração do agente desinfetante oferecido pelo seu envoltório de proteção.

O dióxido de cloro (ClO₂) é outro antimicrobiano que tem sido avaliado no uso em tratamentos de pós-colheita de vegetais. Este composto não se hidrolisa em solução aquosa, sendo estável sob ampla faixa de pH (6 a 10). Uma das vantagens da aplicação do ClO₂ como sanificante é que as concentrações de cloraminas ou trihalometanos são muito baixas. O ClO₂ é mais caro do que os hipocloritos e pode apresentar odor forte. Assim, recomenda-se usar em locais arejados, na dose de 3-5 ppm, por não mais do que 1 min de exposição (BENATO, 2007). A aplicação do dióxido de cloro para desinfecção de águas potáveis, segundo Aieta e Berg (1986), ocorreu em 1944 nas Cataratas do Niágara para o tratamento de águas para abastecimento público. Em 1977, Symons *et al.*, citados pelos mesmos autores, identificaram 103 instalações nos Estados Unidos e 10 no Canadá que estavam utilizando o dióxido de cloro para desinfecção de águas potáveis. Na Itália o ClO₂ é o segundo agente químico mais utilizado para desinfecção de sistemas de abastecimento de água. Em Israel já é utilizado para desinfecção de esgotos domésticos (AIETA e BERG, 1986). Segundo Frizzo *et al.* (2008), no Brasil o uso deste sanificante ainda é pequeno em estações de tratamento de água, sendo seu uso alternativo ao uso do cloro gasoso. Na sua decomposição são formados primeiro os clorito (ClO₃) e depois o clorato (ClO₂), que podem ser observados nas equações:

O ozônio é um potente oxidante e esterilizante, utilizado há muitos anos para desinfecção de água em unidades de tratamento. Utilizado em pequenas concentrações e curto tempo de contato é suficiente para inativar bactérias, fungos, esporos, vírus e protozoários. Os resultados sobre sua eficiência são bastante promissores, porém a suscetibilidade dos microorganismos e sua ação dependem do tipo de produto, da dose, do método de aplicação (água ozonizada ou gás), temperatura, pH do meio, umidade relativa e presença de substâncias orgânicas (PRESTES, 2007). Estudos desenvolvidos por Cavalcante (2007), com alface americana previamente contaminada, demonstraram que 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada no tempo de 1 minuto, na ausência de matéria orgânica, é suficiente para reduzir, no mínimo, 6,57 e 5,27 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7 e esporos de *B. subtilis*, respectivamente. De acordo com Kim *et al.* (1999), o uso de ozônio durante o processo ou estocagem prolonga a vida de prateleira de produtos como frutas e hortaliças, enquanto preserva seus atributos sensoriais além de não produzir resíduos tóxicos ao meio ambiente pós-tratamento.

O ozônio é gerado quando uma corrente alternada de alta voltagem é descarregada na presença de oxigênio (Figura 3). O maior exemplo é o que ocorre na natureza, quando em dias de tempestade há grande produção de ozônio na atmosfera devido às elevadas descargas elétricas provenientes dos relâmpagos. O gerador de ozônio basicamente reproduz, de forma controlada e eficaz, este fenômeno natural, aliando alta tecnologia na área de materiais à eletroeletrônica avançada.

Existem várias motivações para o uso do ozônio como sanificante e duas fortes razões são: é um potente agente oxidante e não é fonte de poluição. A primeira propriedade permite que o ozônio possa oxidar uma série de compostos inorgânicos e orgânicos. A segunda propriedade é que seu produto de degradação é o oxigênio, um produto não poluente e indispensável para as atividades biológicas aeróbias.

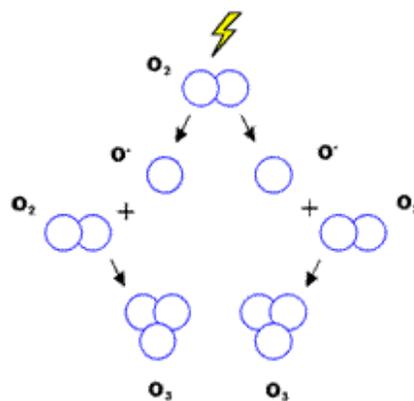


Figura 3. Formação do Ozônio

5. MATERIAL E MÉTODOS

Para atender os objetivos propostos à execução do projeto, esta pesquisa foi conduzida em duas etapas, sendo em ambas empregada a alface americana cultivar *Lorca*. A primeira etapa (1ª etapa) foi executada para definir as concentrações dos diferentes sanitizantes a serem utilizados na segunda etapa (2ª etapa), que foi estruturada para a comparação dos tratamentos com o tratamento testemunha (hipoclorito de sódio).

5.1 Matéria-prima

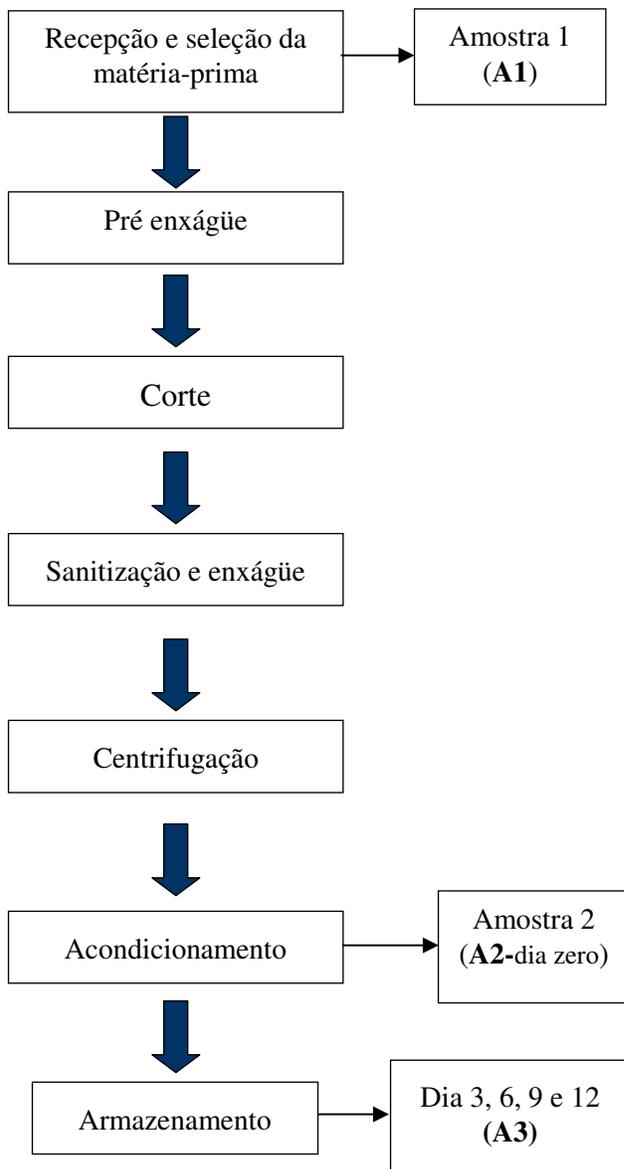
Foi utilizada alface americana, cultivar *Lorca*, adquirida de um produtor da região rural de Campinas (SP), no distrito de Barão Geraldo.

As cabeças de alface foram colhidas manualmente, nas primeiras horas do dia, e apresentavam ponto ótimo de maturidade hortícola, sendo transportadas para o laboratório de Tecnologia Pós-Colheita, da Faculdade de Engenharia Agrícola, da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI/UNICAMP), onde os processamentos foram realizados. Enquanto não era processada, a matéria-prima foi mantida sob refrigeração em câmara fria na temperatura de $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por no máximo 4 horas.

5.2 Processamento Mínimo

Para garantir a sanidade da alface minimamente processada, a área de processamento foi higienizada previamente, seguindo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), bem como todos os utensílios e equipamentos mantidos em seu interior. A sala onde ocorreu o processamento foi mantida à temperatura de $15^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e todas as pessoas envolvidas no processamento utilizaram Equipamentos de Proteção Individual (EPI's), que constou de avental, bota de PVC, touca, máscara e luvas.

O processamento mínimo foi realizado de acordo com o fluxograma, apresentado na figura 4.



Recepção e Seleção: operação de toailete, sendo retiradas às folhas mais externas e sujas, além do coração. Após o toailete foi retirada a amostra 1 (A1).

Pré-enxágüe: importante para retirada de sujidades e restos de cultura. Realizada em água potável, temperatura ambiente, com separação das folhas uma a uma, com auxílio de faca afiada e higienizada

Corte: na área limpa, as folhas foram cortadas aleatoriamente no sentido longitudinal.

Sanitização e enxágüe: aplicação dos tratamentos: hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, ácido peracético, ozônio e água potável (de acordo com o item 5.3).

Centrifugação: remoção do excesso de água da etapa anterior. Foi utilizada centrífuga doméstica (Marca Arno) com velocidade média de 2200rpm, equivalente a 800 g (força), por 90 s.

Acondicionamento: embalagem de polietileno de baixa densidade, 60 µm. Após o acondicionamento foram retiradas três amostras de cada tratamento para análise no dia zero (A2).

Armazenamento: em expositor refrigerado, porta reta a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $95\% \pm 5\%$ de UR. Nos dias 3, 6, 9 e 12 foram retiradas três amostras, por tratamento, para a realização de análises de composição gasosa, microbiológicas, físico-químicas e sensorial.

Figura 4. Fluxograma do processamento mínimo de alface americana, cultivar *Lorca*, com adaptações. (Fonte: DAREZZO, 2004; RINALDI, 2005; CHITARRA e CHITARRA, 2007)

Na 1ª etapa, para cada sanitizante testado, utilizou-se em média 30 kg de alface americana *in natura* e na 2ª etapa, para cada tratamento, foi utilizado em média 50kg, totalizando 200 kg de produto *in natura*.

A opção pela embalagem de 60 µm foi através de indicação do ITAL/CETEA (Instituto de Tecnologia de Alimentos/Centro de Tecnologia de Embalagem) e pela disponibilidade no comércio local.

De acordo com cada tratamento, a alface minimamente processada foi conduzida conforme descrição apresentada nos experimentos que foram realizados.

5.3 Instalação do Experimento

5.3.1- 1ª Etapa: Definição da concentração de dióxido de cloro, ácido peracético e água ozonizada – Nesta etapa, para cada sanitizante, procurou-se definir a concentração adequada para ser utilizada na 2ª etapa. Após os diversos tratamentos, as amostras foram submetidas a análises microbiológicas, físico-químicas e sensorial, no dia zero e nos dias 3, 6, 9 e 12 de armazenamento refrigerado. Nesta etapa também foi realizada a análise de potabilidade da água do laboratório.

Dióxido de cloro (ClO₂)

Baseando-se em estudos realizados por Srebernich (2007), avaliou-se a concentração de 60 mg L⁻¹ de ClO₂, além das concentrações de 40 e 80 mg L⁻¹. Em todas elas, o tempo de imersão da alface foi de 10 minutos. As soluções foram preparadas através de diluição do produto comercial em água potável, sendo primeiramente adicionado o dióxido de cloro estabilizado e em seguida o ativador (ácido acético). A concentração de dióxido na água foi medida através do colorímetro, marca HACH, modelo DR/890.

Ácido Peracético (CH₃-COOOH)

Baseando-se em estudos de Srebernich (2007), avaliou-se a concentração de 100 mg L⁻¹ de CH₃-COOOH, além das concentrações de 50, 60 e 80 mg L⁻¹. Em todas elas, o tempo de imersão da alface foi de 15 minutos. As soluções foram preparadas através da diluição do produto comercial em água potável, previamente resfriada a 5°C.

Água Ozonizada

O equipamento utilizado na produção de ozônio (Figura 5) é da empresa Panozon, constando de gerador de ozônio modelo PNZ 714, que permite o controle da concentração de ozônio produzido de 0,6 a 2,0 mg L⁻¹, cilindro de oxigênio (95 a 99% de pureza), o difusor tem a função de separar o ozônio que permaneceu na forma de gás e retirá-lo da tubulação, enviando-o para um circuito externo onde é destruído (reduzido a oxigênio). A água ozonizada é recirculada em uma vazão de 20 L min⁻¹ para uma cuba de aço inoxidável com capacidade de 50 litros.

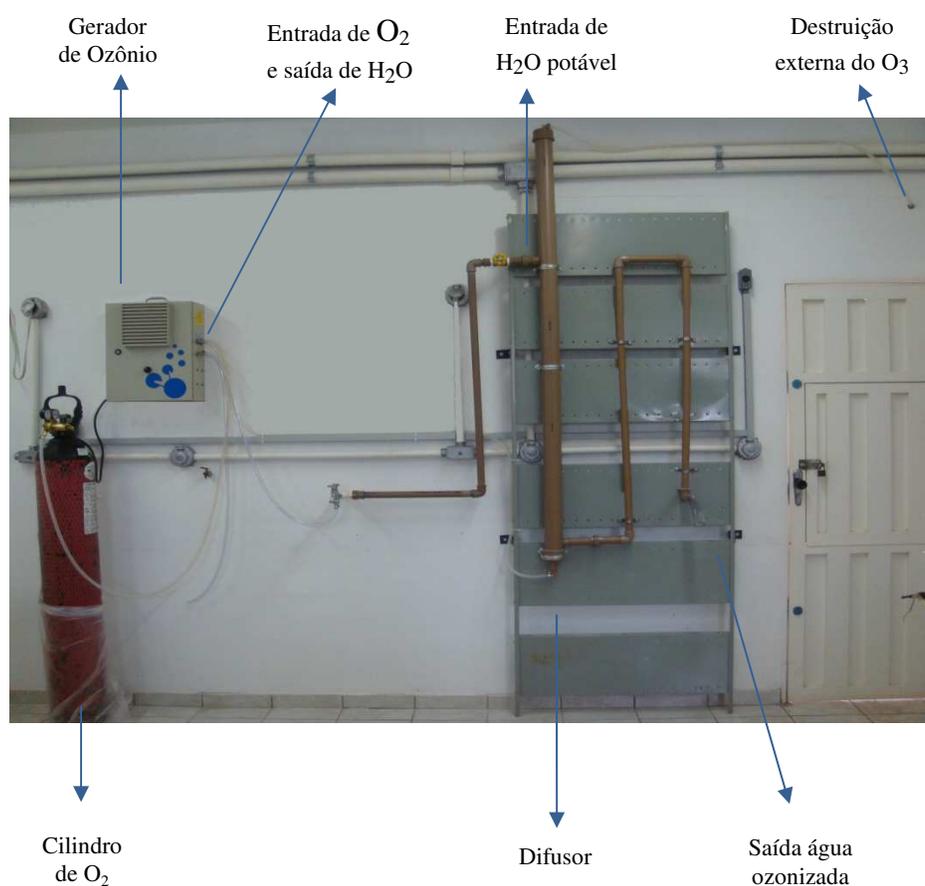


Figura 5. Equipamento gerador de água ozonizada

Neste experimento, a água ozonizada com concentrações de 0,6; 1,2 e 1,8 mg L⁻¹, foram testadas (CAVALCANTE, 2007 e PRESTES, 2007). O tempo de imersão da alface foi de 1 min. A concentração de ozônio na água foi medida com um kit disponível comercialmente, CHEMetrics, Vacu-vials, Ozone K-7402, Calverton, Va., USA. O

equipamento apresentou instabilidade no sistema gerador de ozônio e esse experimento preliminar precisou ser descartado. Em outro momento houve a repetição do experimento em outras concentrações (1,2; 1,4 e 2,0 mg L⁻¹), pois houve dificuldade na geração das concentrações iniciais.

Para todos os tratamentos as folhas de alface processada foram mantidas imersas na solução com auxílio de um escorredor plástico (doméstico), previamente higienizado com o produto a ser testado.

5.3.2- 2ª Etapa: Comparação dos diferentes sanitizantes – tendo definido as melhores concentrações na 1ª etapa, foram realizados 2 ensaios, um no mês de julho e o outro em outubro de 2009, para a comparação dos diferentes sanitizantes. As amostras foram submetidas a análises microbiológicas e físico-químicas, no dia zero e nos dias 3, 6, 9 e 12 de armazenamento refrigerado a 2°C ± 1°C.

A água usada para a diluição das concentrações estava a temperatura ambiente (19°C), pois para o tratamento com ozônio não foi possível resfriá-la e para que esse não fosse um vizez nas análises optou-se por manter a mesma temperatura para todos os tratamentos. Os tratamentos utilizados foram:

T1- Hipoclorito de sódio (NaOCl)

Esse tratamento foi referência para análises de eficiência dos demais tratamentos aplicados. As soluções foram preparadas através de diluição de hipoclorito de sódio, em água potável, na concentração de 150 mg L⁻¹ de cloro livre e o tempo de permanência da alface processada minimamente foi de 15 minutos (BRASIL, 1999; ANDRADE *et al.*, 2007). O pH da solução foi monitorado e quando necessário mantido inferior a 6,8; a verificação da concentração da solução clorada foi realizada utilizando a fita dosadora de concentração de cloro, marca ECOLAB.

T2- Dióxido de cloro (ClO₂)

Foi realizado ensaio na concentração de 60 mg L⁻¹ e o tempo de permanência da alface foi de 10 minutos.

T3 – Ácido Peracético (CH₃-COOOH)

Foi realizado ensaio na concentração de 100 mg L⁻¹ e o tempo de permanência da alface foi de 15 minutos.

T4- Água Ozonizada

Foi realizado ensaio na concentração de 1,2 mg L⁻¹ de água ozonizada com tempo de permanência da alface de 1 minuto.

T5- Água Potável

Esse tratamento consistiu em novo enxágüe em água potável, após a pré-higienização.

5.4 Análises Realizadas

5.4.1 Avaliação microbiológica

Foi considerado como unidade amostral o conteúdo da embalagem, pacote com 200 g do produto minimamente processado. As amostras foram submetidas, em triplicata, às seguintes análises microbiológicas: contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*, contagem de bolores e leveduras e presença/ausência de *Salmonella* spp.

As análises foram realizadas em 6 momentos diferentes: antes do processamento mínimo, após os tratamentos (dia zero) e nos dias 3, 6, 9 e 12 de armazenamento refrigerado (2°C±1°C). Para fins de avaliação microbiológica, foi considerada como população inicial a contagem de microorganismos das amostras antes do processamento mínimo (A1) e como população final, a contagem de microorganismos das amostras após cada tratamento (A2) e após o armazenamento refrigerado (A3). Todas as análises realizadas seguiram metodologias propostas por Silva *et al.* (2007).

Contagem Total de Aeróbios Psicrotróficos: As análises foram realizadas utilizando 25 g de amostra misturadas manualmente com 225 ml de água peptonada. Foi realizada inoculação

por superfície em meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) através de plaqueamento e contagem por Unidade Formadora de Colônia por grama de alimento (UFC g⁻¹).

Contagem Total de Aeróbios Mesófilos: As análises foram realizadas utilizando 25 g de amostra misturadas manualmente com 225 ml de água peptonada. Foi realizada inoculação por profundidade em meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) através de plaqueamento e contagem por UFC g⁻¹.

Coliformes totais, termotolerantes a 45°C e *E. coli*: As análises de bactérias do grupo fecais foram realizadas através do método, do número mais provável (NMP), que inclui as etapas de teste presuntivo com tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e do teste para confirmação com tubos de Caldo Verde Brilhante (VB) e Caldo *E.Coli* (EC), usado para os termotolerantes a 45°C. Para confirmação de *E.coli* foi usado o método tradicional para alimentos, que conta com o uso de placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB).

Salmonella spp.: A análise de *Salmonella* foi realizada pelo método ISO 6579 (2007), utilizando 25 g de amostra misturada manualmente com 225 ml de água peptonada. As análises foram realizadas nos dias 0 (zero) e 3 (três), caso os resultados fossem positivos, seria realizado o acompanhamento com análises durante os demais dias de estocagem. Em caso de amostras iniciais livres da bactéria, foram realizadas outras análises apenas ao fim da estocagem para verificar as boas práticas de fabricação.

Bolores e Leveduras: As análises foram realizadas utilizando 25 g de amostra misturadas manualmente com 225 ml de água peptonada. Foi realizada inoculação por superfície em meio de cultura DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) através de plaqueamento e contagem por UFC g⁻¹.

5.5.2 Análise Sensorial

As amostras foram avaliadas subjetivamente quanto aos atributos de aparência (percepção visual) e aroma (percepção olfativa). Essas avaliações foram realizadas por uma equipe constituída por 6 pessoas, no tempo zero e aos 3, 6, 9 e 12 dias de armazenamento, no ensaio de julho/2009. Os parâmetros de avaliação sensorial foram definidos a partir dos estudos realizados por Darezzo (2004). A ficha de análise sensorial e a descrição dos atributos estão nos anexos 1 e 2.

5.5.3 Análise Físico-Química

As análises foram realizadas através de um homogenato obtido da centrifugação da amostra de alface minimamente processada, em centrífuga doméstica da marca Walita, originando uma porção sólida (bagaço) e outra líquida (suco), a porção sólida foi desprezada e a porção líquida usada como homogenato para as análises. As análises de pH, acidez titulável e sólidos solúveis foram realizadas seguindo procedimentos descritos pela AOAC (1995).

pH: foi medido diretamente por potenciometria, que consiste na imersão do eletrodo do pHmetro digital – na amostra triturada e homogeneizada. Os resultados foram expressos em unidades de pH.

Acidez Titulável (AT): A acidez titulável foi determinada através da titulação de 10 g de amostra triturada, diluída em 90 ml de água destilada, com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1093N. Utilizando-se como ponto de viragem o pH 8,1, com anterior calibração do equipamento em solução tampão de pH 4,0 e 7,0. O resultado foi expresso em % de ácido cítrico.

$$AT = \frac{V_{NaOH} \times N \times 64 \times 100}{m_{amostra} \times 1000} \quad (1)$$

Onde:

AT = g de ácido cítrico anidro 100 g⁻¹;

V_{NaOH} = volume da solução de NaOH adicionada à solução (ml);

N = normalidade da solução de NaOH;

64 = equivalente grama de ácido cítrico;

m_{amostra} = massa da amostra (g).

Sólidos solúveis (SS): foi utilizada leitura direta em refratômetro digital de bancada Reichert, modelo ARIAS 500, utilizando-se duas gotas da amostra triturada e homogeneizada. Os resultados foram expressos em ° Brix;

Teor de ácido ascórbico: foram tomados 1 g do homogenato em um balão de 50 ml que foi preenchido com solução de ácido fosfórico (3%), segundo o Método de Tillmans, com método de titulação com indicador 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI). O líquido foi filtrado e medido 10 ml que posteriormente foi titulado com a solução de DCFI até a viragem da cor rosa persistente por no mínimo 15 segundos. O teor de ácido ascórbico foi calculado pela seguinte equação:

$$Aa = \frac{Vt \times 0,5 / V_{tp} \times V \times 100}{V_a \times m} \quad (2)$$

Onde:

Aa = ácido ascórbico (mg 100 g⁻¹);

Vt = volume de titulação (ml);

0,5 = volume retirado da diluição do ácido ascórbico em água destilada;

V_{tp} = volume titulado na padronização da solução indicadora (ml);

V = volume aferido (ml);

V_a = volume da alíquota (ml);

m = massa de amostra (g).

Determinação da Cor: determinada em amostras não destrutivas com espectrocolorímetro Hunter Lab., com miniscan XE Plus, escala CIELab (L*, a*, b*), parâmetros D65/10° (tipo de luz iluminante - luz do dia/grau do observador - olho humano). A aquisição dos dados foi feita pelo software Universal (versão 4.10). Foram feitas medições nas extremidades e no centro de cada folha e em três folhas por repetição. A partir dos resultados expressos pelo equipamento (L*, a*, b*), foram calculados os índices de coloração: croma, *hue* e o valor de L, através das equações:

$$\begin{aligned} \text{croma} &= (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \\ \text{valor de } L &= (a^*/b^*) \end{aligned} \quad (3)$$

5.5.4 Determinação da composição gasosa no interior das embalagens com o tempo de armazenamento refrigerado ($2^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)

Para determinar a composição gasosa nas embalagens foi realizada leitura direta através de um medidor portátil de concentração de O_2 e CO_2 , PAC CHECK 325 (Mocon, Minneapolis, EUA). A calibração do aparelho foi realizada com a concentração gasosa do meio ambiente (21% de O_2 e 0,03% de CO_2), através de uma agulha para leitura automática. As leituras foram realizadas introduzindo a agulha do aparelho nas embalagens, através de um septo de silicone adaptado às mesmas, através de etiquetas auto adesivas e silicone, isso para evitar o rompimento do filme quando a agulha fosse inserida no mesmo (CASTILHO PIZARRO, 2003). Foram utilizadas três embalagens por tratamento e os resultados foram expressos em % O_2 e % CO_2 . Essa análise aconteceu apenas na 2ª etapa da pesquisa.

5.5.5 Delineamento experimental e Análise estatística

A 1ª etapa foi realizada a partir de Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 3 repetições. Nesta etapa foi considerada a redução microbiológica para cada um dos 3 tratamentos.

A 2ª etapa foi coletada em 2 meses diferentes, julho e outubro de 2009, sendo que para cada tratamento foi coletada 3 amostras e medida cada variável resposta, num total de 30 amostras para cada variável. Para análise físico-química as variáveis respostas foram divididas em pH, teor de ácido ascórbico, acidez titulável, sólidos solúveis e cor, além da composição gasosa.

O experimento utilizado foi aleatorizado em blocos, sendo cada mês utilizado como um bloco, dentro desses blocos, 5 tratamentos com 3 repetições cada um. Para as análises microbiológicas foram utilizadas 3 amostras para cada tratamento.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- 1ª Etapa

A eficiência dos tratamentos foi avaliada pela redução na contagem total de: microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, coliformes totais e termotolerantes a 45°C, *Escherichia Coli*, bolores e leveduras, além da análise de presença/ausência de *Salmonella* spp.. De forma complementar foram realizadas as análises físico-químicas de pH, sólidos solúveis e teor ácido ascórbico.

Dióxido de Cloro

As amostras de alface avaliadas apenas com a retirada de folhas velhas e danificadas, tiveram contagem total de aeróbios mesófilos de $2,7 \times 10^4$ UFC g⁻¹ e a realização da sanitização com dióxido de cloro a 40 mg L⁻¹ (T1); 60 mg L⁻¹ (T2) e 80 mg L⁻¹ (T3), por 10 minutos, contribuiu para a redução de praticamente 1 ciclo logarítmico da população microbiana da alface minimamente processada. Sendo que na concentração de 60 mg L⁻¹ (T2) houve a maior redução ($1,8 \times 10^3$ est).

Tabela 2. População microbiana em alface minimamente processada submetida a sanitização com diferentes concentrações de dióxido de cloro. Valores médios de 3 repetições.

Microrganismo	Tratamentos			
	AP	T1	T2	T3
Mesófilos*	$2,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$ est	$3,4 \times 10^3$
Psicrotróficos*	$3,8 \times 10^4$ est	$2,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
Bolores e Leveduras*	$2,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	$2,7 \times 10^3$
Coliformes Totais**	$>1,1 \times 10^3$	$3,3 \times 10^1$	<3,0	<3,0
Coliformes **	6,2	<3,0	<3,0	<3,0
Termotolerantes a 45°C	6,2	<3,0	<3,0	<3,0

AP= antes do processamento; T1= 40 mg L⁻¹; T2= 60 mg L⁻¹; T3= 80 mg L⁻¹

*Valores expressos em UFC g⁻¹; **Valores expressos em NMP g⁻¹

Para os tratamentos aplicados nas diferentes diluições foi observada a redução da contagem de coliformes totais do valor inicial de $>1,1 \times 10^3$ NMP g^{-1} para $3,3 \times 10^1$ NMP g^{-1} na concentração de 40 mg L^{-1} , e para $<3,0$ NMP g^{-1} nas concentrações de 60 mg L^{-1} e 80 mg L^{-1} , a presença de coliformes totais sinalizam a presença de enteropatógenos, por isso a importância de fazer a confirmação para os termotolerantes e *E.coli*. Na amostra inicial foi encontrado 6,2 NMP g^{-1} de termotolerantes e após a sanitização independente da concentração do sanitizante a contagem foi $<3,0$ NMP g^{-1} ficando dentro dos limites de legislação de 10^2 NMP g^{-1} para esse grupo de microrganismos em hortaliças frescas, sanitizadas, refrigeradas ou congeladas para consumo direto (BRASIL, 2001).

A sanitização mostrou-se eficiente também na redução da contagem de microorganismos aeróbios psicrotóxicos; a contaminação inicial média das amostras foi $3,8 \times 10^4$ est UFC g^{-1} antes do processamento (AP) reduzindo para $2,9 \times 10^4$ UFC g^{-1} , para $2,1 \times 10^4$ UFC g^{-1} e para $2,8 \times 10^4$ UFC g^{-1} , nos tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente, sendo que novamente a diluição de 60 mg L^{-1} apresentou o melhor resultado. Em nenhuma das amostras foram detectadas as presenças de *E.coli* e *Salmonella* spp..

Analisando a Tabela 3 é possível observar que os tratamentos não alteram os parâmetros de pH e sólidos solúveis.

Tabela 3. Análise de variância para pH e sólidos solúveis (°Brix) em diferentes concentrações de dióxido de cloro.

Análise	Tratamento			
	AP	T1	T2	T3
pH	5,84 A	5,88 A	5,98 A	5,85 A
Sólidos Solúveis	2,33 A	2,11 A	2,14 A	2,16 A

AP= antes do processamento; T1= 40 mg L^{-1} ; T2= 60 mg L^{-1} ; T3= 80 mg L^{-1}

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os resultados das análises da população microbiana mostraram que as maiores reduções foram obtidas quando se utilizou dióxido de cloro a 60 mg L^{-1} esse foi um dos fatores que motivou a escolha por essa concentração, correspondendo a indicação de Srebernick (2007).

Ácido Peracético

As amostras de alface avaliadas apenas com a retirada de folhas velhas e danificadas, tiveram contagem total de aeróbios mesófilos de $5,7 \times 10^4$ UFC g^{-1} e de psicrotróficos de $4,8 \times 10^4$ UFC g^{-1} e a sanitização mostrou-se eficiente na redução da contagem desses microorganismos para todas as diluições analisadas. Para mesófilos a redução foi de 1 ciclo logarítmico para os tratamentos 1 e 2 e de 2 ciclos logarítmicos para os tratamentos 3 e 4, sendo que no tratamento a 100 mg L^{-1} , o valor passou de $5,7 \times 10^4$ UFC g^{-1} para $3,1 \times 10^2$ UFC g^{-1} , sendo o melhor resultado encontrado.

Para os psicrotróficos, a contaminação inicial média das amostras foi $4,8 \times 10^4$ UFC g^{-1} antes do processamento (AP) reduzindo para $3,8 \times 10^4$ UFC g^{-1} , para $3,2 \times 10^4$ UFC g^{-1} , para $2,9 \times 10^3$ UFC g^{-1} e para $2,7 \times 10^2$ UFC g^{-1} nos tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, sendo que novamente a diluição de 100 mg L^{-1} apresentou o melhor resultado, com redução de 2 ciclos logarítmicos.

Tabela 4. População microbiana em alface minimamente processada submetida a diferentes concentrações de ácido peracético. Valores médios de 3 repetições.

Microorganismo	Tratamento				
	AP	T1	T2	T3	T4
Mesófilos*	$5,7 \times 10^4$	$4,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$3,7 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$
Psicrotróficos*	$4,8 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$
Bolores e Leveduras*	$3,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$	$2,78 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$
Coliformes Totais**	$>1,1 \times 10^3$	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$
Coliformes** Termotolerantes a 45°C	9,4	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$

AP= antes do processamento; T1= 50 mg L^{-1} ; T2= 60 mg L^{-1} ; T3= 80 mg L^{-1} ; T4= 100 mg L^{-1}

*Valores expressos em UFC g^{-1} ; **Valores expressos em NMP g^{-1}

Para os tratamentos aplicados nas diferentes concentrações foi observada a redução da contagem de coliformes totais inicial de $>1,1 \times 10^3$ NMP g^{-1} para $< 3,0$ NMP g^{-1} em todas as concentrações. Para os termotolerantes, tanto a amostra AP, como as amostras submetidas a sanitização ficaram dentro dos limites de legislação de 10^2 NMP g^{-1} para hortaliças frescas, sanitizadas, refrigeradas ou congeladas para consumo direto (BRASIL, 2001).

Em nenhuma das amostras foram detectadas as presenças de *E.coli* e *Salmonella* spp..

Tabela 5. Análise de variância para pH e sólidos solúveis (°Brix) em diferentes concentrações de ácido peracético.

Análise	Tratamento				
	AP	T1	T2	T3	T4
pH	5,98 B	5,77 A	5,78 A	5,75 A	5,81 A
Sólidos Solúveis	3,66 B	3,14 A	3,11 A	3,16 A	3,06 A

AP= antes do processamento; T1= 50 mg L⁻¹; T2= 60 mg L⁻¹; T3= 80 mg L⁻¹; T4= 100 mg L⁻¹
Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Analisando a Tabela 5 é possível observar que todas as amostras submetidas ao ácido peracético são estatisticamente iguais e diferem do produto antes do processamento, para esse composto químico usado na sanitização existe uma alteração nos valores de pH e sólidos solúveis.

Observando os resultados da redução da população microbiana é possível verificar que o melhor resultado foi obtido quando se utilizou o ácido peracético na concentração de 100 mg L⁻¹, sendo esse um dos fatores que motivou a escolha por essa concentração, correspondendo a indicação de Srebernich (2007).

Água Ozonizada

A sanitização da alface minimamente processada com água ozonizada mostrou-se eficiente na redução da contagem de microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotóxicos, a contaminação inicial média das amostras foi de 1,9x10⁶ UFC g⁻¹ e 2,1x10⁶ UFC g⁻¹, respectivamente, compatível com o esperado para a microbiota natural de hortaliças, reduzindo para 6,3x10³ UFC g⁻¹ e para 2,8x10³ UFC g⁻¹, respectivamente, após o T2 (1,2 mg L⁻¹).

A realização da lavagem contribuiu não só para a remoção de sujidades, mas também para a redução de microorganismos provenientes do solo, os mesmos resultados foram encontrados por Lund (2005) e Perdigão (2004), quando analisaram uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada e

qualidade sanitária inicial de hortaliças e eficiência da lavagem, respectivamente. Após a lavagem com água a média total de mesófilos aeróbios foi de $4,1 \times 10^4$ UFC g^{-1} , demonstrando que essa operação contribui para a redução desses microrganismos.

Tabela 6. População microbiana em alface minimamente processada submetida a diferentes concentrações de ozônio. Valores médios de 3 repetições.

Microrganismo	Tratamento				
	AP	T1	T2	T3	T4
Mesófilos*	$1,9 \times 10^6$	$4,1 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$	$7,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
Psicrotróficos*	$2,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$	$4,8 \times 10^4$	<10 est
Bolores e Leveduras*	$>1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	<1,8
Coliformes Totais**	$>1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	<1,8
Coliformes** termotolerantes a 45°C	6,1	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0

AP= antes do processamento; T1= lavado com água; T2= $1,2 \text{ mg L}^{-1}$; T3= $1,4 \text{ mg L}^{-1}$; T4= $2,0 \text{ mg L}^{-1}$

*Valores expressos em UFC g^{-1} ;

**Valores expressos em NMP g^{-1}

Para os tratamentos aplicados nas diferentes concentrações de ozônio foi observada a redução da contagem de coliformes totais do valor inicial de $>1,1 \times 10^3$ NMP g^{-1} para $2,3 \times 10^1$ NMP g^{-1} na concentração de 1,2 e $1,4 \text{ mg L}^{-1}$, e para $<1,8$ NMP g^{-1} na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, para os termotolerantes a 45°C a contagem inicial foi de 6,1 NMP g^{-1} e após a sanitização nas diferentes concentrações esses valores ficaram $<3,0$ NMP g^{-1} , dentro dos limites da legislação de 10^2 NMP g^{-1} para hortaliças (frescas, sanitizadas, refrigeradas ou congeladas para consumo direto) (BRASIL, 2001). A contagem de coliformes totais podem indicar falha na observação das boas práticas dentro da cadeia de produção, além de ser indicador da presença de enteropatógenos. Em nenhuma das amostras foram detectadas as presenças de *E.coli* e *Salmonella* spp..

Analisando a Tabela 7 é possível observar que T2 e T4 são estatisticamente iguais, mas diferentes de AP, T1 e T3, para a variável pH neste experimento e para sólidos solúveis AP, T2 e T3 são estatisticamente iguais. Sendo que T2 e T3 são estatisticamente iguais a AP e T1, porém AP e T1 são diferentes entre si.

Tabela 7. Análise de variância para pH e sólidos solúveis (°Brix) em diferentes concentrações de água ozonizada.

Análise	Tratamento				
	AP	T2	T3	T4	T5
pH	5,84 B	5,88 B	5,98 A	5,85 B	6,02 A
Sólidos Solúveis	2,35 A	1,56 B	2,13 AB	2,06 AB	1,75 AB

AP= antes do processamento; T2= lavado com água; T3= 1,2 mg L⁻¹; T4= 1,4 mg L⁻¹; T5= 2,0 mg L⁻¹
Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Observando os resultados é possível verificar que as maiores reduções da carga microbiana foi obtida quando se utilizou água ozonizada a 1,2 mg L⁻¹, sendo este um dos fatores que motivou a escolha por essa concentração na 2ª fase de análise, além de que na concentração 2,0 mg L⁻¹ o odor de maresia, característico do ozônio, foi intenso e isso levou a opção pela menor concentração com um bom resultado.

6.2- 2ª Etapa

6.2.1 Avaliação da Qualidade Microbiológica da alface minimamente processada

A legislação brasileira, ANVISA – Resolução RDC 12 (BRASIL, 2001), indica como padrão microbiológico para hortaliças, legumes e similares – frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas para consumo a contagem de 10² UFC g⁻¹ de coliformes totais, sendo que faz parte deste grupo os coliformes termotolerantes a 45°C e ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra. Independente dos tratamentos de imersão aplicados, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. na análise qualitativa, realizada antes e logo após o processamento mínimo, e *E.coli* nas amostras de alface minimamente processadas durante os 12 dias de armazenamento refrigerado a 2°C±1°C. Estes resultados garantiram que o produto estava dentro dos padrões preconizados pela legislação.

Na Tabela 8 estão os resultados da contagem de coliformes totais na alface minimamente processada durante os 12 dias de armazenamento refrigerado para os meses

de julho e outubro de 2009. Logo após o processamento mínimo, a alface apresentou uma redução na contagem para todos os tratamentos exceto para o T5 (lavado com água), porém a redução maior foi para o tratamento com dióxido de cloro (T2), que se manteve inalterada até o sexto dia de armazenamento, para os dois ensaios. Os demais tratamentos também apresentaram redução em comparação ao produto antes do processamento (AP), sendo que os tratamentos 1 e 2 mantiveram a contagem durante todo período de armazenamento para os dois períodos de análises. No 6º dia de análise para o mês de outubro todos os tratamentos apresentaram contagem $<3,0$ UFC g^{-1} . Estes resultados fugiram dos valores esperados, podendo ter existido um erro no laboratório.

Tabela 8. Contagem de coliformes totais (UFC g^{-1}) em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a $2^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ por 12 dias em julho e outubro/2009.

Tratamentos	Ensaio julho					
	Dias de armazenamento					
	AP	0	3	6	9	12
T1		$2,4 \times 10^2$				
T2		$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$9,2 \times 10^1$	$9,2 \times 10^1$
T3	$> 1,1 \times 10^3$	$9,4 \times 10^1$	$9,4 \times 10^1$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
T4		$2,3 \times 10^2$				
T5		$> 1,1 \times 10^3$				
Ensaio outubro						
T1		$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$< 3,0$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
T2		$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$9,2 \times 10^1$	$9,2 \times 10^1$
T3	$> 1,1 \times 10^3$	$9,4 \times 10^1$	$9,4 \times 10^1$	$< 3,0$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
T4		$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$< 3,0$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
T5		$> 1,1 \times 10^3$	$> 1,1 \times 10^3$	$< 3,0$	$4,6 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$

AP= antes do processamento; T1. Hipoclorito de sódio ($150 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T2. Dióxido de cloro ($60 \text{ mg L}^{-1}/10 \text{ min}$); T3. Ácido Peracético ($100 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T4. Água ozonizada ($1,2 \text{ mg L}^{-1}/1 \text{ min}$); T5. Água Potável.

No 12º dia de armazenamento refrigerado, o produto tratado com dióxido de cloro apresentou redução de 2 ciclos logarítmicos, em relação ao produto antes do processamento, sendo sua contaminação inferior aos demais tratamentos, onde a alface minimamente processada apresentou redução de 1 ciclo logarítmico na contagem de

coliformes totais. Mesmo não havendo parâmetros na legislação, Berbari *et al.* (2001) afirmam que populações de coliformes totais no nível de 10^5 UFC g^{-1} (5 log), correspondem à elevada contaminação desse microrganismo no produto, indicando final de vida de prateleira. Os dados obtidos neste experimento não ultrapassam 10^3 UFC g^{-1} (3 log), porém visualmente as amostras não tinham mais valor comercial ao final dos 12 dias de armazenamento a $2^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, sendo que o 6º dia de armazenamento apresentou os melhores resultados para os tratamentos testados.

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos na alface minimamente processada está apresentada na Tabela 9. A contagem inicial foi de 5 ciclos e 6 ciclos logarítmicos para o produto antes do processamento, nos meses de julho e outubro/2009, respectivamente, sendo que o tratamento apenas com água reduziu em 1 ciclo a contaminação inicial do produto, enquanto o tratamento com ácido peracético reduziu em 5 ciclos em relação ao dia zero no experimento de julho e 3 ciclos no experimento de outubro.

A alface minimamente processada submetida ao tratamento com hipoclorito de sódio apresentou melhor resultado no 12º dia de armazenamento, para o experimento realizado em julho, se comparado aos demais tratamentos, com aumento de 2 ciclos logarítmicos em relação ao dia zero, enquanto o tratamento com ácido peracético aumentou 5 ciclos. Para o experimento realizado em outubro, houve um crescimento maior desses microrganismos e pode estar relacionada a temperatura, pois no mês de julho a temperatura média foi de $17^{\circ}C$, enquanto que em outubro foi próxima de $22^{\circ}C$ (CIIAGRO, 2009), o que pode ter influenciado na qualidade do produto recebido do campo, uma vez que o crescimento microbiano tem relação direta com a temperatura. Para o tratamento com água ozonizada houve manutenção de 4 ciclos logarítmicos desde o dia 0 até o 12º dia de armazenamento refrigerado no mês de julho, o mesmo não ocorreu no mês de outubro.

Ao comparar os resultados desse experimento com outros trabalhos realizados com alface processada minimamente, constatou-se que Barriga *et al.* (1991) também observou aumento de 2 a 3 ciclos logarítmicos de microrganismos aeróbios mesófilos, variando de 10^4 a 10^7 UFC g^{-1} durante 12 dias de armazenamento em atmosfera modificada a $4^{\circ}C$. Ao comparar os resultados obtidos neste experimento com outros trabalhos realizados com hortaliças, constatou-se que Babic e Watada (1996) encontraram valores iniciais de 10^7 a 10^8 UFC g^{-1} na população de microrganismos aeróbios mesófilos, em folhas de espinafre

minimamente processadas, com aumento para 10^{10} UFC g^{-1} , durante 9 dias de armazenamento. Rinaldi (2005) observou variação de 4 a 7 ciclos logarítmicos para repolho minimamente processado armazenado em diferentes embalagens e em atmosfera passiva e ativa.

Tabela 9. Contagem de total de microrganismos aeróbios mesófilos (UFC g^{-1}) em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a $2^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ por 12 dias em julho e outubro/2009.

Tratamentos	Ensaio julho					
	Dias de armazenamento					
	AP	0	3	6	9	12
T1		$1,7 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4$ est	$2,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$
T2		$5,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$ est	$1,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$ est	$2,0 \times 10^5$
T3	$1,5 \times 10^5$ est	<10 est	$1,9 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$ est	$1,1 \times 10^5$
T4		$1,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$ est	$2,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$ est
T5		$2,1 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2$ est	$4,2 \times 10^3$ est	$4,3 \times 10^3$ est	$> 6,5 \times 10^6$ est
Ensaio outubro						
T1		$1,7 \times 10^4$	$9,7 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$3,7 \times 10^5$ est	$1,3 \times 10^6$ est
T2		$1,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$ est	$2,7 \times 10^6$ est
T3	$> 6,5 \times 10^6$ est	$3,5 \times 10^3$	$8,3 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5$ est	$3,4 \times 10^6$ est
T4		$1,6 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$7,7 \times 10^5$ est	$1,1 \times 10^6$ est	$1,1 \times 10^6$ est
T5		$5,6 \times 10^4$ est	$2,7 \times 10^5$ est	$3,1 \times 10^5$ est	$1,5 \times 10^6$ est	$1,0 \times 10^6$ est

AP= antes do processamento; T1. Hipoclorito de sódio ($150 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T2. Dióxido de cloro ($60 \text{ mg L}^{-1}/10 \text{ min}$); T3. Ácido Peracético ($100 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T4. Água ozonizada ($1,2 \text{ mg L}^{-1}/1 \text{ min}$); T5. Água Potável.

Os microrganismos aeróbios psicrotróficos são importantes para os alimentos minimamente processados, uma vez que podem crescer em temperaturas de refrigeração entre $0^{\circ}C$ e $7^{\circ}C$ e os mais importantes para vegetais refrigerados são as espécies de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Yersinia*, pois causam amolecimento e deterioração (MOREIRA *et.al.*, 2009). Neste experimento foram realizadas apenas a contagem total de aeróbios psicrotróficos, sem determinação de espécies (Tabela 10).

No experimento de julho a alface minimamente processada submetida aos diferentes sanitizantes, no dia zero, teve a contaminação inicial de aeróbios psicrotróficos

reduzida em 1 ciclo logarítmico para o tratamento 5, em 2 ciclos para os tratamentos 2 e 4, em 3 ciclos para o tratamento 1 e em 5 ciclos para o tratamento 3, em relação ao produto antes do processamento. No 6º dia de armazenamento refrigerado as amostras submetidas aos tratamentos com hipoclorito de sódio (T1) apresentaram o melhor resultado, seguido do tratamento com ácido peracético (T3) e água ozonizada (T4); ao final do 12º dia de armazenamento refrigerado, os tratamentos 1 e 3 apresentaram os melhores resultados, porém o T3 não apresentava condições de comercialização.

Para o experimento realizado em outubro, a a contaminação inicial da alface minimamente processada submetida aos diferentes sanitizantes, foi eduzida em 1 ciclo logarítmico para o tratamento 1, em 2 ciclos para o tratamento 3 e para os demais tratamentos (2, 4 e 5) não houve redução significativa em relação ao produto antes do processamento (Tabela 10).

Tabela 10. Contagem total de aeróbios psicrotróficos em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C ±1°C por 12 dias em julho e outubro/2009.

Tratamentos	Ensaio julho					
	Dias de armazenamento					
	AP	0	3	6	9	12
T1		3,7x10 ²	4,2x10 ²	4,6x10 ²	6,3x10 ³	7,6x10 ⁴
T2		3,9x10 ³	1,6x10 ⁴	1,7x10 ⁴	1,9x10 ⁵	1,5x10 ⁵
T3	8,5x10 ⁵ est	<10 est	1,5x10 ²	2,7x10 ³	3,9x10 ⁴	6,4x10 ⁴
T4		5,2x10 ³	1,0x10 ³	4,3x10 ³	1,1x10 ⁴	2,4x10 ⁵
T5		3,9x10 ⁴	6,7x10 ⁴	2,3x10 ⁴	2,3x10 ⁵	2,2x10 ⁵
Ensaio outubro						
T1		7,1x10 ³	1,2x10 ⁵	5,4x10 ⁴	1,5x10 ⁵ est	2,1x10 ²
T2		2,7x10 ⁴	4,6x10 ⁴	7,6x10 ⁴	9,9x10 ⁵ est	8,8x10 ⁴
T3	4,8x10 ⁴ est	3,6x10 ²	5,4x10 ³	4,6x10 ⁴	1,1x10 ⁵	5,1x10 ⁵
T4		6,7x10 ⁴	7,8 x10 ⁴	1,4x10 ⁶ est	3,9x10 ⁵	2,1x10 ⁵
T5		3,0x10 ⁴ est	4,0x10 ⁵ est	>6,5x10 ⁶ est	1,4x10 ⁶ est	>6,5x10 ⁶ est

AP= antes do processamento; T1. Hipoclorito de sódio (150 mg L⁻¹/15 min); T2. Dióxido de cloro (60 mg L⁻¹/10 min); T3. Ácido Peracético (100 mg L⁻¹/15 min); T4. Água ozonizada (1,2 mg L⁻¹/1 min); T5. Água Potável.

Como pode ser observado na Tabela 11, a matéria-prima utilizada mostrou elevada contaminação inicial por bolores e leveduras, uma vez que, no geral, populações no nível de 10^4 UFC g^{-1} (julho/2009) e 10^6 UFC g^{-1} (outubro/2009) foram encontradas nas alfaces sem lavagem alguma. Quando a operação de lavagem com água potável foi efetuada uma redução inicial de 1 ciclo logarítmico foi observada no experimento de julho/2009 o mesmo não foi observado no experimento de outubro/2009. A alface minimamente processada submetida aos tratamentos 1, 2 e 3 teve reduzida em 2 ciclos logarítmicos a contaminação inicial de bolores e leveduras, no mês de julho, enquanto que a redução foi de 5 ciclos logarítmicos para os tratamentos 1 e 2 no mês de outubro.

Tabela 11. Contagem de bolores e leveduras (UFC g^{-1}) em alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a $2^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ por 12 dias em julho e outubro/2009.

Tratamentos	Ensaio julho					
	Dias de armazenamento					
	AP	0	3	6	9	12
T1		$1,6 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$8,2 \times 10^4$
T2		$2,6 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3$	$7,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
T3	$2,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$5,4 \times 10^3$	$4,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
T4		$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
T5		$5,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$
Ensaio outubro						
T1		$5,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^6$ est	$2,6 \times 10^3$
T2		$6,0 \times 10^1$	$2,9 \times 10^3$	$5,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$ est	$1,1 \times 10^5$
T3	$1,03 \times 10^6$ est	$1,4 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$6,3 \times 10^5$ est	$5,5 \times 10^5$
T4		$5,3 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^6$ est	$4,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$
T5		$1,1 \times 10^6$ est	$5,3 \times 10^4$ est	$>6,5 \times 10^6$ est	$>6,5 \times 10^6$ est	$>6,5 \times 10^6$ est

AP= antes do processamento; T1. Hipoclorito de sódio ($150 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T2. Dióxido de cloro ($60 \text{ mg L}^{-1}/10 \text{ min}$); T3. Ácido Peracético ($100 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T4. Água ozonizada ($1,2 \text{ mg L}^{-1}/1 \text{ min}$); T5. Água Potável.

Ao nono dia de armazenamento refrigerado, no mês de outubro, verificou-se uma alteração de 5 ciclos logarítmicos da carga microbiana inicial, para os tratamentos com hipoclorito de sódio e dióxido de cloro, ou seja uma contagem maior que 10^5 UFC g^{-1} de bolores e leveduras, valor bastante alto com indicação do término da vida de prateleira do produto. Os resultados observados, tanto para o mês de julho quanto para o mês de outubro,

são superiores aos encontrados por Sigrist (2002) que não observou contagens superiores a 10^2 UFC g^{-1} , durante o armazenamento de couve-flor e rúcula minimamente processadas.

A legislação não estabelece parâmetros ou faz referência a fungos, entretanto, Berbari *et al.* (2001) afirmam que populações de fungos no nível de 10^4 UFC g^{-1} (4 log) correspondem à elevada contaminação desses microrganismos no produto. Estes autores também afirmam que a operação de lavagem com água potável, reduz em 1 ciclo logarítmico a contagem de fungos. Neste experimento, observou-se a redução de 1 ciclo logarítmico na contaminação de bolores e leveduras para os tratamentos água ozonizada e água potável, de antes para depois da sanitização, enquanto que para os demais tratamentos houve redução inicial de 2 ciclos logarítmicos, no mês de julho. Para o mês de outubro, essa relação não foi observada para o tratamento com água, mas sim para os outros tratamentos.

Analisando a Tabela 11, verifica-se que, no mês de julho, inicialmente todos os tratamentos apresentaram alguma redução na população de bolores e leveduras, sendo esta redução mantida no limite tolerável até o 9º dia apenas para o tratamento com hipoclorito de sódio ($2,4 \times 10^3$ UFC g^{-1}). Para os tratamentos 2 e 3 até o 6º dia, ($7,2 \times 10^3$ e $5,4 \times 10^3$ UFC g^{-1} , respectivamente) e para os demais tratamentos apenas para o dia zero. Para o mês de outubro, apenas o tratamento com hipoclorito de sódio (T1) apresenta-se em níveis aceitáveis até o 6º dia de armazenamento, os tratamentos com dióxido de cloro e água ozonizada até o 3º dia de armazenamento. Os resultados obtidos neste experimento para o ácido peracético diferem dos obtidos por Srebernich (2007) quando analisou cheiro verde.

Uma vez que a sensibilidade de diferentes bactérias a determinados sanitizantes é variável, o objetivo principal da sanitização de hortaliças é a segurança do alimento através da eliminação desses microrganismos, e assim a escolha do produto sanitizante deve ser feita em função do patógeno e/ou deteriorante mais problemático e das circunstâncias e necessidades do momento. Além de que, a redução observada nas contagens microbianas não devem ser atribuída apenas ao agente sanitizante, mas deve-se considerar que o efeito pode estar ligado a remoção de células na lavagem inicial, em água de boa qualidade.

Os resultados da análise microbiológica não devem ser decisivos para determinar a extensão da vida de prateleira da alface processada minimamente, pois esta depende de outros fatores, tais como: cor e aparência (análise sensorial), atributos de qualidade que definem a compra ou não do produto pelo consumidor.

6.2.2 Avaliação da qualidade físico-química da alface minimamente processada

Os valores referentes aos parâmetros pH, acidez titulável, sólidos solúveis e ácido ascórbico, encontram-se expostos na Tabela 12, para o mês de julho e na Tabela 13 para o mês de outubro. Analisando os resultados obtidos é possível afirmar com 95% de confiança que não existe diferença significativa entre os tratamentos para a variável acidez titulável (AT) e sólidos solúveis (SS).

O sabor dos vegetais frescos resulta da combinação de compostos voláteis com açúcar e ácidos. A análise da concentração de sólidos solúveis se faz importante uma vez que os carboidratos, que também conferem sabor doce ao vegetal, são fontes energéticas para o crescimento de microrganismos. O consumo desses açúcares pelos microrganismos pode ser medido pelos graus Brix, ou pela razão Brix/acidez, conforme propõe Shewfelt (1987).

Os valores de teor de ácido ascórbico oscilaram entre 9,61 a 24,01 mg ácido ascórbico kg^{-1} , durante os 12 dias de armazenamento no mês de julho (Tabela 12). Para o tratamento com hipoclorito de sódio a variação foi de 15,56 no dia zero para 12,88 mg de AA kg^{-1} no 12º dia e para os demais tratamentos houve uma elevação dos valores, sendo que para o tratamento com ácido peracético a variação foi de 9,61 para 12,13 mg de aa kg^{-1} , sendo a alface considerada uma importante fonte deste nutriente.

Com relação ao pH os valores oscilaram de 5,77 para o tratamento 3 até 7,87 para o tratamento 2, ambos no dia zero, com uma variação significativa durante os 12 dias de armazenamento refrigerado (Tabela 12).

Para o mês de outubro, a variação nos valores de ácido ascórbico foi de 6,43 a 21,89 mg de ácido ascórbico kg^{-1} , durante os 12 dias de armazenamento (Tabela 13). Para o tratamento com hipoclorito de sódio a variação foi de 12,32 no dia zero para 9,56 mg de aa kg^{-1} no 12º dia e para os demais tratamentos houve uma pequena variação dos valores, para mais ou para menos, sendo que para o tratamento com ácido peracético a variação foi de 7,60 para a 9,27 mg de aa kg^{-1} .

Tabela 12. Variação das médias atribuídas aos parâmetros ácido ascórbico, acidez titulável, pH e sólidos solúveis obtidos na alface americana minimamente processada, submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C ±1°C por 12 dias em julho/2009.

Tratamento	Dia	AA (mg de aa kg ⁻¹)	AT (%)	pH	SS (°Brix)
T1	0	15,56	0,03	5,98	3,04
	3	12,48	0,03	6,15	2,77
	6	23,95	0,03	6,49	2,78
	9	23,68	0,03	6,28	3,81
	12	12,88	0,03	6,27	3,27
T2	0	13,63	0,03	7,87	3,06
	3	10,39	0,03	6,19	2,45
	6	23,07	0,03	6,47	2,94
	9	18,72	0,03	6,29	2,98
	12	15,05	0,03	6,29	2,85
T3	0	9,61	0,03	5,77	3,14
	3	9,68	0,03	6,10	2,51
	6	23,47	0,03	6,21	2,91
	9	12,97	0,04	6,25	3,43
	12	12,13	0,04	6,23	2,43
T4	0	12,47	0,03	6,07	2,65
	3	11,78	0,03	6,19	3,29
	6	19,54	0,03	6,20	4,08
	9	18,84	0,04	6,24	3,71
	12	16,70	0,04	6,09	2,90
T5	0	12,87	0,04	6,00	3,66
	3	16,98	0,03	6,21	2,63
	6	24,01	0,03	6,19	3,24
	9	19,26	0,04	6,08	3,63
	12	16,09	0,04	6,19	4,14

T1. Hipoclorito de sódio (150 mg L⁻¹/15 min); T2. Dióxido de cloro (60 mg L⁻¹/10 min); T3. Ácido Peracético (100 mg L⁻¹/15 min); T4. Água ozonizada (1,2 mg L⁻¹/1 min); T5. Água Potável.

Analisando a Tabela 13, é possível observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos durante os dias de armazenamento refrigerado, para a acidez titulável, embora tenha apresentado tendência a elevação com o decorrer do armazenamento e com a intensidade do acréscimo, variando de acordo com cada tratamento. Observa-se que os

teores de acidez nem sempre estão coerentes com os valores de pH, já que o esperado seria menores valores de pH relacionados a maiores valores de acidez.

Tabela 13. Variação das médias atribuídas aos parâmetros ácido ascórbico, acidez titulável, pH e sólidos solúveis obtidos na alface americana minimamente processada, submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C ±1°C por 12 dias em outubro/2009.

Tratamento	Dia	AA (mg de aa kg ⁻¹)	AT (%)	pH	SS (°Brix)
T1	0	12,32	0,03	5,98	4,47
	3	08,15	0,04	6,27	3,93
	6	17,90	0,03	6,41	3,55
	9	16,32	0,03	6,27	5,71
	12	09,56	0,04	6,30	4,40
T2	0	10,45	0,03	6,87	4,17
	3	07,11	0,03	6,28	3,02
	6	16,00	0,03	6,41	3,89
	9	12,36	0,03	6,31	4,05
	12	10,74	0,03	6,29	3,68
T3	0	07,60	0,03	5,79	4,40
	3	06,43	0,03	6,20	3,21
	6	16,22	0,03	6,29	3,92
	9	10,00	0,03	6,22	4,96
	12	09,27	0,03	6,23	2,85
T4	0	10,75	0,03	6,08	3,53
	3	09,74	0,03	6,22	4,77
	6	14,11	0,03	6,18	6,25
	9	21,87	0,04	6,23	5,44
	12	10,76	0,04	6,11	3,74
T5	0	11,36	0,03	6,03	5,46
	3	11,71	0,03	6,10	3,46
	6	19,04	0,03	6,19	4,47
	9	13,97	0,04	6,12	5,42
	12	11,17	0,04	6,19	6,27

T1. Hipoclorito de sódio (150 mg L⁻¹/15 min); T2. Dióxido de cloro (60 mg L⁻¹/10 min); T3. Ácido Peracético (100 mg L⁻¹/15 min); T4. Água ozonizada (1,2 mg L⁻¹/1 min); T5. Água Potável.

Observando os valores de pH é possível analisar que a variação não foi significativa entre os tratamentos oscilando de 5,79 para o tratamento 3 até 6,87 para o tratamento 2, ambos no dia zero, com uma variação não significativa durante os 12 dias de armazenamento refrigerado.

Segundo Roura *et al.* (2000), logo após o processamento mínimo o tecido vegetal apresenta maior taxa respiratória, levando a um decréscimo acentuado da acidez no início do armazenamento, devido o consumo de ácidos orgânicos no processo respiratório. Os maiores valores, ou seja, menor perda de ácidos orgânicos, foram observados no tratamento 4 e 5, não diferenciando-se estatisticamente entre si. Nas Tabelas 12 e 13, é possível observar que os teores de acidez titulável relatados neste experimento (julho e outubro) diferem dos descritos por Bolin e Huxsoll (1991), que ao trabalhar com alface ‘Iceberg’ pré-cortada, embalada e exposta a 2°C, obteve teores na ordem de 0,49%.

Os teores de sólidos solúveis (Tabelas 12 e 13) nos meses de julho e outubro apresentaram comportamento irregular, embora tenha prevalecido a tendência a queda dos mesmos. Esta tendência de queda é esperada, pois na tentativa de manter suas funções vitais, os açúcares, constituintes predominantes dos sólidos solúveis, são utilizados como substrato respiratório no decorrer da fase de senescência do produto. Em contrapartida, pode ocorrer o acréscimo deste teor em decorrência da perda de água do produto estocado e conseqüente aumento do teor. Os valores descritos neste experimento foram semelhantes aos relatados por Bolin e Huxsoll (1991) para a alface ‘Iceberg’ acondicionada e estocada a 2°C, com teores em torno de 2,8 e dos resultados reportados por Darezzo (2004) para alface americana ‘Lorca’ processada minimamente, com teores em torno de 3,5. A maior redução para sólidos solúveis ocorreu para os tratamentos 2 e 3, para as duas repetições (julho e outubro), porém sem diferença estatística entre os tratamentos. Quanto maior a taxa respiratória do produto, maior será o consumo de reservas do vegetal. Dessa forma, observa-se que a redução dos sólidos solúveis ocorre principalmente no início do armazenamento, na tentativa de manter-se em seu estado inicial. O aumento dos sólidos solúveis, em alguns períodos e tratamentos, pode ter ocorrido devido às variações nas amostras de alface minimamente processada ou a perda de água do produto, sendo que, segundo Silva *et al.* (2003), o aumento nos valores de sólidos solúveis normalmente ocorre nos produtos processados devido à perda de água do produto. Quanto a esta afirmação, neste experimento

não foi realizada análises de perda de massa do produto durante o armazenamento, por isso não se pode fazer conclusões.

6.2.3 Avaliação da cor da alface minimamente processada

A avaliação da cor da alface minimamente processada foi realizada apenas na repetição do experimento no mês de outubro/2009. O resultado confirmou sua coloração verde, uma vez que o parâmetro a^* negativo tende à cor verde (Tabela 14).

Tabela 14. Valores médios de a^* para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias em outubro/2009.

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
T1	-8,36	-6,18	-9,42	-6,84	-6,64
T2	-7,66	-4,95	-6,24	-6,59	-6,44
T3	-9,52	-6,81	-7,98	-3,21	-3,11
T4	-6,63	-7,68	-7,98	-8,06	-8,15
T5	-8,61	-5,98	-9,19	-7,82	-7,63

T1. Hipoclorito de sódio ($150 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T2. Dióxido de cloro ($60 \text{ mg L}^{-1}/10 \text{ min}$); T3. Ácido Peracético ($100 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T4. Água ozonizada ($1,2 \text{ mg L}^{-1}/1 \text{ min}$); T5. Água Potável

Os valores de L^* não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos variando de 50,94 a 60,75, no decorrer dos 12 dias de armazenamento refrigerado, sendo que para o tratamento com hipoclorito de sódio a variação foi de 57,08 no dia zero, para 53,63 no 6º dia e 51,10 no 12º dia de armazenamento a $2^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$. Analisando a Tabela 15, pode-se observar que o tratamento com ácido peracético variou positivamente de 50,94 no dia zero, para 58,23 no 6º dia e 60,75 no 12º dia de armazenamento. Isto se deve a aparência de folha queimada ou cozida, com a intensidade do verde muito mais perceptível. Neste caso a alface minimamente processada perdeu seu valor comercial no 6º dia de armazenamento (Figura 8).

Tabela 15. Valores médios de L^* para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a $2^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias em outubro/2009.

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
T1	57,08	52,33	53,63	51,71	51,10
T2	57,29	60,16	57,03	57,27	57,15
T3	50,94	53,15	58,23	59,49	60,75
T4	56,06	52,19	53,06	53,66	53,36
T5	51,58	54,85	50,65	53,65	52,15

T1. Hipoclorito de sódio ($150 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T2. Dióxido de cloro ($60 \text{ mg L}^{-1}/10 \text{ min}$); T3. Ácido Peracético ($100 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T4. Água ozonizada ($1,2 \text{ mg L}^{-1}/1 \text{ min}$); T5. Água Potável

Para cor, que indica o grau de saturação da cor, o maior índice foi encontrado no dia zero para o tratamento 1 (31,93), seguido do tratamento 4 (31,08) e o menor índice foi encontrado no 12º dia para o tratamento 3 (24,39), seguido do tratamento 1 (27,04), conforme Tabela 16.

Tabela 16. Valores médios de Cromat* para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a $2^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias em outubro/2009.

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
T1	31,93	24,62	28,82	27,93	27,04
T2	28,33	25,81	28,57	28,18	27,78
T3	29,55	26,29	30,18	27,29	24,39
T4	31,08	26,82	28,47	28,52	28,57
T5	29,68	26,51	29,19	29,21	29,23

T1. Hipoclorito de sódio ($150 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T2. Dióxido de cloro ($60 \text{ mg L}^{-1}/10 \text{ min}$); T3. Ácido Peracético ($100 \text{ mg L}^{-1}/15 \text{ min}$); T4. Água ozonizada ($1,2 \text{ mg L}^{-1}/1 \text{ min}$); T5. Água Potável

O ângulo *Hue* (h) é expresso em graus, onde 0° está no eixo $+a^*$ (vermelho), 90° no eixo $+b^*$ (amarelo), 180° no eixo $-a^*$ (verde), e 270° no eixo $-b^*$ (azul). Observando a Tabela 17 é possível afirmar que neste experimento para todos os tratamentos aplicados não houve diferença significativa para os valores de *hue*. No dia zero não houve diferença significativa entre os atributos cor, aroma, turbidez e aparecimento de manchas, porém no decorrer do armazenamento foi possível observar as diferenças entre os tratamentos. O

tratamento 3 no 3º dia apresentou manchas mais escuras e o 6º dia foi o limite para comercialização do produto. O tratamento 2 (dióxido de cloro) apresentou manchas rosadas no dia zero e durante o armazenamento, mas especialmente no 3º dia de análise.

Tabela 17. Valores médios de *hue** para alface minimamente processada sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C±1°C por 12 dias em outubro/2009.

Tratamentos	Dias de armazenamento				
	0	3	6	9	12
T1	179,73	179,74	179,66	179,70	179,74
T2	179,73	179,81	179,78	179,77	179,76
T3	179,67	179,75	179,73	179,82	179,90
T4	179,76	179,70	179,71	179,71	179,72
T5	179,71	179,79	179,68	179,70	179,72

T1. Hipoclorito de sódio (150 mg L⁻¹/15 min); T2. Dióxido de cloro (60 mg L⁻¹/10 min); T3. Ácido Peracético (100 mg L⁻¹/15 min); T4. Água ozonizada (1,2 mg L⁻¹/1 min); T5. Água Potável

A seguir estão apresentadas as figuras 6, 7, 8, 9 e 10 correspondentes a aparência visual da alface minimamente processada para os tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Dia 0



Dia 3



Dia 6



Dia 9



Dia 12



Figura 6. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com hipoclorito de sódio (T1), armazenadas a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias. Julho de 2009.

Dia Zero



Dia 3



Dia 6



Dia 9



Dia 12



Figura 7. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com dióxido de cloro (T2), armazenadas $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias. Julho de 2009.

Dia Zero



Dia 3



Dia 6



Dia 9



Dia 12



Figura 8. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com ácido peracético (T3), armazenadas a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias. Julho de 2009.

Dia Zero



Dia 3



Dia 6



Dia 9



Dia 12



Figura 9. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com água ozonizada (T4), armazenadas a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias. Julho de 2009.

Dia Zero



Dia 3



Dia 6



Dia 9



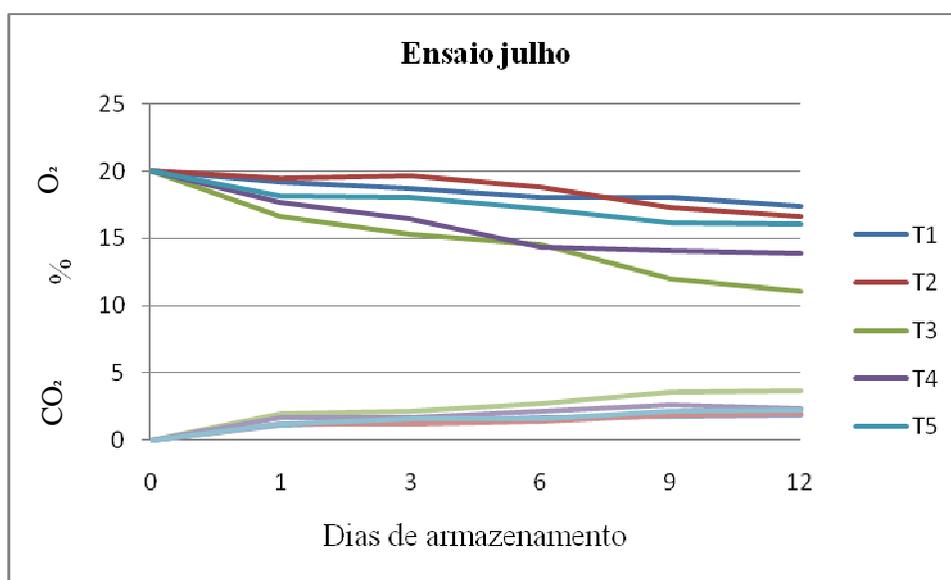
Dia 12



Figura 10. Fotos da alface americana minimamente processada sanitizada com água potável (T5), armazenadas a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 dias. Julho de 2009.

6.2.4 Avaliação da composição gasosa no interior das embalagens de alface minimamente processada

Os dados referentes à composição gasosa no interior da embalagem da alface minimamente processada encontram-se nas Figuras 11 e 12 para os meses de julho e outubro, respectivamente. A alface minimamente processada submetida ao tratamento 3 apresentou maior redução do O₂ durante o armazenamento, tanto para o experimento realizado em julho, quanto para o experimento realizado em outubro, indicando maior atividade respiratória na aplicação deste tratamento.



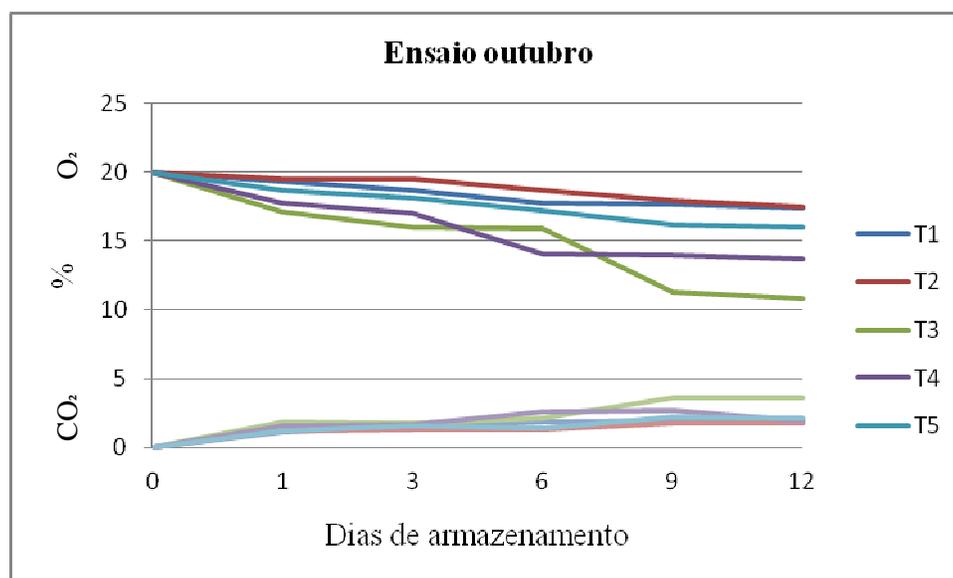
T1. Hipoclorito de sódio (150 mg L⁻¹/15 min); T2. Dióxido de cloro (60 mg L⁻¹/10 min); T3. Ácido Peracético (100 mg L⁻¹/15 min); T4. Água ozonizada (1,2 mg L⁻¹/1 min); T5. Água Potável

Figura 11. Variação da concentração de O₂ e CO₂ no interior da embalagem de alface minimamente processada submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C ±1°C por 12 dias. Julho, 2009

Observa-se que para a variável O₂ ocorreu variação significativa entre os tratamentos durante o armazenamento. Sendo que os tratamentos 1, 2 e 5 apresentaram as maiores médias e os tratamentos 3 e 4 as menores.

Os tratamentos que se mantiveram constante ao longo dos dias de armazenamento refrigerado foram T1 e T5 para a variável O₂ (Figura 11).

Analisando a Figura 12 é possível observar que o tratamento 3 apresentou maior concentração de CO₂ no interior da embalagem, enquanto os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre eles.



T1. Hipoclorito de sódio (150 mg L⁻¹/15 min); T2. Dióxido de cloro (60 mg L⁻¹/10 min); T3. Ácido Peracético (100 mg L⁻¹/15 min); T4. Água ozonizada (1,2 mg L⁻¹/1 min); T5. Água Potável; AP= antes do processamento

Figura 12. Variação da concentração de CO₂ no interior da embalagem de alface processada minimamente submetida a diferentes produtos sanitizantes, armazenadas a 2°C ±1°C por 12 dias. Outubro, 2009.

A taxa respiratória é regulada por enzimas cuja atividade sofre influência de alguns fatores, entre eles a temperatura. Neste experimento todos os tratamentos foram submetidos às mesmas temperaturas de processamento e armazenamento, portanto, essa variável provavelmente interferiu de modo semelhante em todos eles.

Pode-se verificar pela Figura 13, que a concentração de CO₂ aumentou em todos os tratamentos até o 9º dia e se manteve quase sem alteração no 12º dia, com exceção do tratamento 3, para os dois experimentos realizados (julho e outubro). Já o tratamento 4 no mês de outubro apresentou uma queda na concentração de CO₂ no interior da embalagem do 9º para o 12º dia de armazenamento.

É possível observar que as concentrações de O₂ e CO₂ permaneceram estáveis no dia 0 e 3, para os dois ensaios. Tendendo a alterações a partir do 6º dia de armazenamento.

6.2.5 Análise Sensorial

A Tabela 18 mostra os resultados obtidos da avaliação sensorial da alface minimamente processada, submetida a diferentes compostos sanitizantes e armazenadas a 2°C ±1°C por 12 dias. Observando estes resultados, pode-se verificar que os tratamentos estudados não provocaram diferença entre as amostras no que diz respeito a cor, textura e aparência até o terceiro dia de armazenamento. Sendo que os tratamentos com dióxido de cloro (T2) e ácido peracético (T3) já apresentavam algumas manchas escuras nas folhas e escurecimento de nervuras, fazendo com que a avaliação global da aparência ficasse comprometida.

Com o decorrer da estocagem, houve perda da intensidade da cor verde e da turgidez, depleção da impressão global da aparência, acréscimo dos escurecimentos de nervuras e bordas, e progressão do aspecto cozido e do aparecimento de manchas escuras, especialmente no tratamento 3 (Figura 8). Os tratamentos 1 e 5 mantiveram-se sem alterações significativas pelos maiores períodos de tempo e mostraram-se mais eficientes na conservação da qualidade visual da alface minimamente processada até o nono dia de armazenamento refrigerado. Esse acréscimo significativo para o escurecimento de nervuras, pode ter relação com a atividade enzimática, responsável pelo escurecimento dos tecidos e diretamente relacionada à atividade metabólica do produto.

Para turgidez os tratamentos 1 e 5 foram os que apresentaram melhor nota, resultado esse que pode ser atribuído à menor taxa respiratória da alface minimamente processada, gerando menor calor respiratório e limitando a perda de água do produto armazenado.

Tabela 18. Valores médios dos atributos sensoriais da alface minimamente processada, sanitizada com diferentes produtos, armazenadas a 2°C ±1°C. Julho, 2009.

1ª Data de Avaliação (dia zero)						
Tratamento	Intensidade da Cor Verde Turgidez	Turgidez	Escurecimento de nervures	Escurecimento de bordas	Aspecto Cozido	Impressão Global da aparência
T1	8,18a	9,73a	0	0	0	8,86a
T2	7,97a	9,56a	0	0	0	8,81a
T3	7,96a	9,77a	0	0	0	8,79a
T4	7,99a	9,76a	0	0	0	8,83a
T5	8,02a	9,79a	0	0	0	8,96a
2ª Data de Avaliação (3º dia)						
Tratamento	Intensidade da Cor Verde Turgidez	Turgidez	Escurecimento de nervures	Escurecimento de bordas	Aspecto Cozido	Impressão Global da aparência
T1	8,02a	8,68a	0,09c	0	0	8,45a
T2	7,86a	8,77a	0,58a	0	0	7,68b
T3	7,74b	8,69a	0,67a	0,15a	0,2a	7,59b
T4	7,98a	8,78a	0,14b	0	0	8,09a
T5	8,01a	8,99a	0,13b	0	0	8,37a
3ª Data de Avaliação (6º dia)						
Tratamento	Intensidade da Cor Verde Turgidez	Turgidez	Escurecimento de nervures	Escurecimento de bordas	Aspecto Cozido	Impressão Global da aparência
T1	7,48a	8,01a	0,19e	0,13b	0	7,29a
T2	7,45b	7,05b	0,99b	0,16b	0	5,98b
T3	7,36b	6,95c	1,34a	0,19a	7,87a	5,14c
T4	7,56a	7,77a	0,44d	0,14b	0	6,39b
T5	7,64a	7,99a	0,67c	0,16b	0	7,11a
4ª Data de Avaliação (9º dia)						
Tratamento	Intensidade da Cor Verde Turgidez	Turgidez	Escurecimento de nervures	Escurecimento de bordas	Aspecto Cozido	Impressão Global da aparência
T1	6,56a	7,79a	0,21e	0,64d	0,55e	6,96a
T2	5,91c	4,18c	1,55b	2,05b	1,17c	0,98c
T3	5,76c	2,53d	1,98a	2,73a	8,41a	0e
T4	6,13b	6,86b	0,65d	1,98b	1,46b	5,88b
T5	6,44a	6,97b	0,83c	1,38c	0,89d	6,89a

T1. Hipoclorito de sódio (150 mg L⁻¹/15 min); T2. Dióxido de cloro (60 mg L⁻¹/10 min); T3. Ácido Peracético (100 mg L⁻¹/15 min); T4. Água ozonizada (1,2 mg L⁻¹/1 min); T5. Água Potável

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si.

O escurecimento das bordas é um fator limitante na manutenção da qualidade visual da alface minimamente processada e está diretamente relacionado a manutenção da temperatura. Para esse experimento, não houve diferença significativa para esse atributo entre os diferentes tratamentos, durante os 6 primeiros dias de armazenamento a $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, mas para os demais dias de armazenamento refrigerado houve diferença significativa entre os compostos sanitizantes usados, sendo que no nono dia o tratamento com hipoclorito de sódio (T1) apresentava a melhor impressão global, seguido da amostra lavada apenas com água (T5), enquanto a amostra tratada com ácido peracético (T3) não apresentava condições de comercialização. As análises sensoriais do 12º dia de armazenamento foram desconsideradas pelas condições das amostras estarem inadequadas.

O atributo cozido verificado no tratamento com ácido peracético (T3) iniciou no 3º dia de armazenamento refrigerado, mas foi intensificado a partir do 6º dia, o que interferiu negativamente na impressão global da aparência, sendo que no nono dia, a aparência da alface estava totalmente descaracterizada.

7. CONCLUSÕES

Considerando as análises microbiológicas realizadas, os produtos dióxido de cloro, ácido peracético e água ozonizada promoveram redução na contagem da população microbiana na alface americana minimamente processada e podem ser usados como substitutos ao hipoclorito de sódio.

O ácido peracético a 100 mg L^{-1} , por 10 minutos, apresentou bons resultados e pode ser usado como alternativa ao hipoclorito de sódio, porém sua vida de prateleira não ultrapassou o 6º dia, enquanto o hipoclorito de sódio chegou ao 12º dia de armazenamento refrigerado ($2^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) em boas condições de comercialização.

A alface submetida a sanitização com dióxido de cloro apresentou boas condições de comercialização até o 6º dia, assim como o hipoclorito de sódio, com contagem microbiológica inferior ao produto referência, neste mesmo período.

A água ozonizada apresentou resultados semelhantes ao hipoclorito de sódio na redução de coliformes totais e na análise sensorial, porém para mesófilos e psicrotróficos os resultados não superaram o hipoclorito de sódio, embora tenha reduzido a população microbiana quando comparado a amostra antes do processamento.

A composição gasosa da alface minimamente processada sanitizada com ácido peracético foi a que apresentou maior variação de O_2 e CO_2 dentro da embalagem, sugerindo maior estresse no tecido, a partir do 6º dia de armazenamento refrigerado.

A aplicação dos diferentes compostos sanitizantes não interferiram nas características físico-químicas da alface americana minimamente processada.

Os resultados deste trabalho indicaram que até o 6º dia de armazenamento refrigerado os compostos estudados são potencialmente substitutos ao hipoclorito de sódio, mas não indicaram o armazenamento até o 12º dia. Sendo que o dióxido de cloro e o ácido peracético apresentaram os melhores resultados até o 3º dia de armazenamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILA, J.S.; SASAKI, F.F.; HEIFFIG, M.G.O.; GALLO, C.R.; JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A. Determination of microorganisms in fresh-cut radishes. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v.24, n.01, p.75-78, 2006.

AIETA, M.E.; BERG, J.D. A Review of Chlorine Dioxide in Drinking Water Treatment. **Journal of the Water Works Association - Research e Technology**, pg. 62-72, Jun. 1986.

ANDRADE, N.J.; BASTOS, M.S.R.; ANTUNES, M.A. Higienização e Sanitização. In: MORETTI, C.L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças e SEBRAE, 2007, cap.3, p.102-120.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry**. Arlington, Virginia, USA. 16 ed., v.2, 1141p., 1995.

ARRUDA, M.C.; JACOMINO, A.P.; SPOTO, M.H.F.; GALLO, C.R.; MORETTI, C.L. Conservação de Melão Rendilhado Minimamente Processado sob Atmosfera Modificada Ativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p.53-58, jan./mar. 2004.

BABIC, I.; WATADA, A.E. Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, p.187-193, 1996.

BARI, M.L.; NAZUKA, E.; SABINA, Y.; TODORIKI, S.; ISSHIKI, K. Chemical and irradiation treatments for killing Escherichia coli O157:H7 on alfafa, radish, and mung bean seed. **Journal of Food Protection**, v.66. n.05, p.767-774, 2003.

BARRIGA, M.I.; TRACHY, G.; WILLEMOT, C.; SIMARD, R.E. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1586-1588, 1991.

BENATO, E.A. Manuseio, aspectos fitossanitários e logística de caqui pós-colheita. **TODA FRUTA**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=9524>. Acesso em 10 julho 2007.

BERBARI, S.A.G.; PASCHOALINO, J.E.; SILVEIRA, N.F.A.. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.02, p.197-201, 2001.

BEUCHAT, L.R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infections**, v.4, p.413-323, 2002.

BOLIN, H.R.; HUXSOLL, C.C. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. **Journal of Food Science**, v.56, n.1, p.60-67, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução Portaria nº 122, de 29 de novembro de 1993. **Inclui na Portaria nº15, de 23/08/88, sub anexo 1, alínea I, o princípio ativo ÁCIDO PERACÉTICO, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes.** D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de dezembro de 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução Portaria nº6, de 10 de março de 1999 (CVS-6/99). Aprova o Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. Publicada em 12 de março de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução PORTARIA N.º 1469, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Publicada em 02 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 08 de janeiro de 2004. Aprova o uso do ÁCIDO ACÉTICO como coadjuvante de tecnologia na função de agente de controle de microrganismos na lavagem de ovos, carcaças e ou partes de animais de açougue, peixes e crustáceos e hortifrutícolas em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de janeiro de 2004.

CANTWELL, M.I.; SUSLOW, T.V. Postharvest handling systems: fresh-cut fruits and vegetables. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest Technology of Horticultural Crops**, cap.36, p.445-464, 2002.

CARDOSO, C.C.; VEIGA, S.M.O.M.; NASCIMENTO, L.C.; FIORINI, J.E.; AMARAL, L.A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.01, p.59-61, 2003.

CASTILHO PIZARRO, C.A. **Avaliação de melão minimamente processado armazenado em diferentes temperaturas e embalagens.** 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003.

CORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL (CATI). Mapa das principais atividades agrícolas do estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/Cati/servicos/mapa/culturas/alface.htm>>. Acessado em: 20 jan 2007.

CAVALCANTE, D.A. **Avaliação do tratamento com água ozonizada para higienização de alface (*Lactuca sativa*)**. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

CEASA-CAMPINAS. Centrais de Abastecimento de Campinas S.A. **Cultura da alface**. Disponível em: <<http://www.ceasacampinas.com.br/pd01b.htm>>. Acesso em: 02 março 2002.

CEASA-CAMPINAS. Centrais de Abastecimento de Campinas S.A. Alface. Disponível em: <http://www.ceasacampinas.com.br/novo/Serv_Hortifrutis_Alface.asp>. Acesso em: 14 novembro 2006.

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

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

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. CIIAGRO. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br>>. Acesso em: 20 dezembro 2009.

CONDIE, W.L. Toxicological Problems Associed with Chlorine Dioxide. **Journal of the Water Works Association**. Research e Tecnology, pg. 73-78, June, 1986.

COSTA, J.B. **Avaliação ecotoxicológica de efluente de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta**. 180f. Tese (Doutorado em Ciências de Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.

DAREZZO, H.M. **Determinação de composição gasosa e sistemas de embalagens adequadas para conservação de alface americana ‘lorca’ minimamente processada**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.

EMBRAPA/HORTALIÇAS. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/alface.htm> Acesso em: 15 julho 2006.

EMBRAPA/HORTALIÇAS. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/alface.htm> Acesso em: 21 jan 2007.

FAO, Ministério da Saúde de Portugal/Direcção Geral da Saúde, Instituto de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. 2005.

FOOD DRUG ADMINISTRATION. **Secondary direct food additives permitted in food for human consumption.** Code of federal regulations. Title 21 – Foods and Drugs. v.3.Revised in april-2002. Part 173. Section 173.315.2000. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov./>>. Acesso em: 12 fevereiro 2007.

FRIZZO, E.E.; SPIANDORELLO, F.B.; CAMPANI, G.A. **Uso do dióxido de cloro no tratamento de água – ETA Parque da Imprensa, SAMAE, Caxias do Sul.RS.** Disponível em: <http://www.semasa.sp.gov.br/Documentos/Publicar_Internet/trabalhos/trabalho_145.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2008.

HILGREN, J.D.; SALVERDA, J.A. Antimicrobial efficacy of a peroxyacetic/octanoic acid mixture in fresh-cut-vegetable process waters. **Journal of Food Science**, v.65, n.8, p.1376-1379, 2000.

IAC. Instituto Agronômico de Campinas. **Boletim 200 – Alface.** Publicado em 09/08/2005.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999.

KHORDAGUI, H. K. e MANCY, H. K.. Formation of Trihalomethanes During Disinfection of Drinking Water. *Water Quality Bulletin*, v.8, 37-43, 1983.

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

LUND, G.D.; PETRINI, L.A.; ALEIXO, J.A.G.; ROMBALDI, C.V. Uso de sanitantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1431-1435, nov./dez. 2005.

MAISTRO, L.C. Alface minimamente processada: Uma Revisão. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n.03, p.219-224, 2001.

MEYER, S.T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n.01, p.99-110, 1994.

MENEZES, E.M.S.; FERNANDES, E.C.; SABAA-SRUR, A.U.O. Minimally processed smooth lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) stored at modified atmosphere: physical, chemical and physico-chemical analysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.01, p.60-62, 2005.

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

MOREIRA, C.G.; VIEITES, R.L.; EVANGELISTA, R.M. Avaliação microbiológica de melão Cantaloupe minimamente processado submetido a doses de radiação gama. **Cultivando o Saber**. Cascavel, v.2, n.2, p.86-95, 2009

NASCIMENTO, M.S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.

OKURA, M.H.; MARIANO, A.M.E.; TEIXEIRA, A.N.S. Eficiência de sanitizantes no tratamento minimamente processado de alface cultivada em meio hidropônico. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.142, p.105-113, 2006.

OLIVEIRA, M.L.S.; FIGUEIREDO, E.L.; LOURENÇO, L.F.H.; LOURENÇO, V.V. Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.) e tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.143, p.96-101, ago. 2006.

PANZA, S.G.A.; BROTHRERHOOD, R.; ANDREOTTI, A.; REZENDE, C. BALERONI, F.H.; PAROSCHI, V.H.B. Avaliação das condições higiênico-sanitárias durante a manipulação dos alimentos, em um restaurante universitário, antes e depois do treinamento dos manipuladores. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 138, p. 15-19, 2006.

PERDIGÃO, M.L.P.G. **Avaliação do processo de sanificação química na linha de produção de saladas cruas em um restaurante industrial**. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

PRESTES, E.B. **Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas. 2007.

PINHEIRO, N.M.S. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.01, p.153-156, 2005.

PIROVANI, M.E.; PIAGENTINI, A.M.; GOMES, D.R.; DIPENTIMA, J.H. Quality of minimally processed lettuce as influenced by packaging and chemical treatment. **Journal of Food Quality**, Westport, v.22, p.475-484, 1998.

RICO, D., MARTIN-DIANA, A.B., BARAT, J.M., BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.373-386, 2007.

RINALDI, M.M. **Conservação de repolho minimamente processado em diferentes sistemas de embalagem**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas. 2005.

RODRIGUES, G.; ALVES, M.A.B.F.; MALUF, W.R. Hortaliças minimamente processadas. In: **Boletim Técnico de Hortaliças**, n.31. 1ª ed. Lavras: UFLA, jul. 1999.

ROURA, S.I.; DAVIDOVICH, L.A.; DEL VALLE, C.E. Quality loss in minimally processed swiss chard related to amount of damaged area. **Lebensm-Wiss und Technology**, v.23, n.1, p.53-39, 2000.

SANTOS, C.L. **O Controle de Trihalometanos (THM) nas Águas de Abastecimento Público**. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1989.

SAPERS, G.M.; MILLER, R.L.; MATARAZZO, A.M. Effectiveness of sanitizing agents in inactivating E. coli in Golden Delicious apples. **Journal of Food Science**, v.64, n.4, p.734-737, 1999.

SHEWFELT, R.L. Quality of Minimally Processed Fruits and Vegetables. **Journal of Food Quality**, v.10, p.143-156, 1987.

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

SIGRIST, J.M.M. **Estudos fisiológicos e tecnológicos de couve-flor e rúcula minimamente processadas**. 112p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

SILVA, A.C.O.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; MORAES, C.F.A.M.P.; SOUZA, M.R.; TAVAREZ F.A. Radiação em alimentos. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.139, p.17-23, 2006.

SILVA, V.V.; SOARES, N.F.F; GERALDINE, R.M. Efeito da embalagem e temperatura de estocagem na conservação de mandioca minimamente processada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p.197-202, jul./dez. 2003.

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**. 3ªed., São Paulo: Varela, 2007.

SREBERNICH, S.M. Using chlorine dioxide and peracetic acid as substitutes for sodium hypochlorite in the sanitization of minimally processed green seasoning. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.744-750, 2007.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS/NEPA – UNICAMP (Núcleo de Estudos e Pesquisas Alimentação). Versão II. 2 ed. Campinas, SP, 2006.

TANCREDI, R.C.P.; MORAES, O.M.; MARIN, V.A. Vigilância sanitária do município do Rio de Janeiro: Considerações sobre as ações fiscais na área de alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19 n.135, p.21-26, 2005.

TAKAYANAGUI, O.M.; OLIVEIRA, C.D.; BERGAMINI, A.M.M.; CAPUANO, D.M.; OKINO, M.H.T.; FEBRÔNIO, L.H.P.; CASTRO e SILVA, A.A.M.C.; OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO, E.G.A.; TAKAYANAGUI, A.M.M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 01, p. 37-41, 2001.

UFLA (Universidade Federal de Lavras) - Departamento de agricultura. **Boletim técnico de hortaliças**. n.31. 2006.

VANETTI, M.C.D. Segurança microbiológica em produtos minimamente processados. *In: III Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças*. Resumos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 242p., 30-32. 2004.

VIEITES, R.L.; EVANGELISTA, R.M.; CAMPOS, A.J.; MOREIRA, G.C. Efeito da radiação gama na sanitização da manga minimamente processada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.135, p.68-73, 2005.

VITTI, M.C.D. Efeito do momento de sanitização sobre atributos físico-químicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v.22, n.04, p.718-721, 2004.

WISNIEWSKY, M.A.; GLATZ, B.A.;GLEASON, M.L.; REITMEIER, C.A. Reduction of E. coli O157:H7 counts on whole fresh apples by treatment with sanitizers. **Journal of Food Protection**, v.63, n.6, p.703-708, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1. Ficha de atributos sensoriais referentes a aparência e aroma da alface minimamente processada (Fonte: DAREZZO, 2004)

ATRIBUTOS	DEFINIÇÕES
APARÊNCIA - PERCEPÇÃO VISUAL	
Intensidade da cor verde	Tonalidade do verde característico da alface americana
Turgidez	Aspecto viçoso e saudável da alface fresca
Escurecimento de nervuras	Áreas avermelhadas e/ou amarronzadas localizadas na região de corte da nervura central
Escurecimento de bordas	Áreas avermelhadas e/ou amarronzadas localizadas na extremidade das folhas ou na região de corte do limbo foliar
Cozido	Aspecto amolecido, deteriorado, enegrecido e melado, apresentando exsudação
Aparecimento de manchas escuras	Pontuações uniformes e avermelhadas localizadas na nervura central
Impressão Global da aparência	Aspecto geral, abrangendo todos os demais atributos que conferem qualidade
AROMA - PERCEPÇÃO OLFATIVA	
Aroma característico	Aroma de alface fresco
Aroma fermentado	Cheiro desagradável da alface fermentada ou em estágio avançado de deterioração

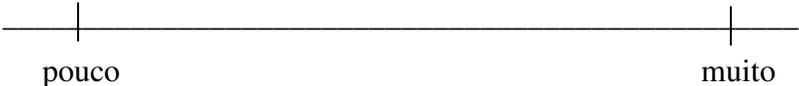
ANEXO 2. Ficha para análise sensorial da alface minimamente processada

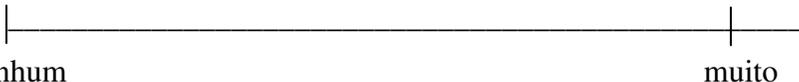
Nome: _____ Data: _____

Nº Amostra: _____

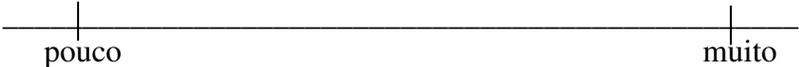
Você está recebendo uma amostra de alface minimamente processada. Por favor, avalie a amostra quanto ao aroma e aparência, marcando nas escalas abaixo.

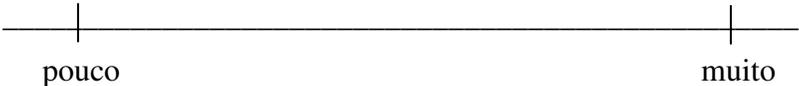
Aroma

Característico 

Fermentado 

Aparência

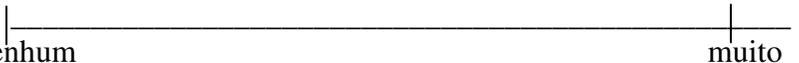
Intensidade da cor verde 

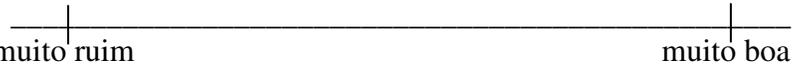
Turgidez 

Escurecimento da nevura 

Escurecimento da das bordas (queimado) 

Cozido 

Manchas escuras 

Impressão global da aparência 

Comentários: _____