

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO OZÔNIO COMO SANITIZANTE
EM HORTALIÇAS FOLHOSAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

ELIZABETH BIAGIONI PRESTES

Bióloga

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutora
em Tecnologia de Alimentos

CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO OZÔNIO COMO SANITIZANTE
EM HORTALIÇAS FOLHOSAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

ELIZABETH BIAGIONI PRESTES

Bióloga

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutora
em Tecnologia de Alimentos

DRA. NELIANE FERRAZ DE ARRUDA SILVEIRA

Orientadora

CAMPINAS

Fevereiro – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P926s Prestes, Elizabeth Biagioni
Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças
folhosas minimamente processadas / Elizabeth Biagioni Prestes. –
Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Neliane Ferraz de Arruda Silveira
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Hortaliças. 2. Sanitização. 3. Processamento mínimo. 4.
Cloro. 5. Ozônio. I. Silveira, Neliane Ferraz de Arruda. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of ozone efficiency as a sanitizer on minimally
processed vegetables

Palavras-chave em inglês (Keywords): Vegetables, Sanitation, Minimal processing,
Chlorine, Ozone

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Nelson Horacio Pezoa García

Hilary Castle de Menezes

Maria Fernanda Pontes Penteado Moretzsohn de Castro

José Maria Monteiro Sigríst

José Luiz Pereira

Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Neliane Ferraz de Arruda Silveira
(Orientadora)

Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García
(Membro)

Prof^a. Dr^a. Hilary Castle de Menezes
(Membro)

Dr^a. Maria Fernanda Pontes Penteado Moretzsohn de Castro
(Membro)

Dr. José Maria Monteiro Sigrist
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores.

Se não houver flores, valeu a sombra das folhas.

Se não houver folhas, valeu a intenção da semente!”

Henfil

Esta tese é dedicada:

A DEUS,

Que me deu Tudo na vida e agora mais este presente!

Amém!

A você, meu querido marido,

Sendo a minha história dividida em antes e depois de 2002, ano em que me fez conhecer o sentimento mais puro, eterno, verdadeiro, intenso e infinito que pode haver, o AMOR. Quando entrou em minha vida, começou a fazer parte dela e agora e para sempre é a minha vida e a minha felicidade! Meu marido, lhe serei eternamente grata por todo o apoio, compreensão, paciência e AMOR que sempre teve comigo, pelas infinitas horas ao meu lado, firme e forte! E naqueles momentos mais difíceis em que parece que não há mais o que fazer, seu amor me deu a força necessária para continuar, continuar... e finalmente, chegar até o fim! Obrigada por me ensinar a trilharmos os caminhos sempre “juntinhos” construindo a nossa linda história de amor! Esta tese também é sua, meu amor! Te amarei para sempre!

A vocês, meus queridos pais e irmão,

Por quem serei eternamente grata, e mesmo assim ainda será muito pouco! À tão admirável, admirada e tão amada mulher, minha mãe Laís, que me colocou no mundo e dedicou sua vida a mim, me ensinando como ninguém o verdadeiro significado da palavra AMOR e me deu colo e tanto carinho nos momentos mais difíceis e em toda a minha vida! Ao poderoso, admirado e tão amado homem, meu pai Manoel, que me ensinou com firmeza a trilhar o caminho do Bem, me deu segurança e a sua mão nos momentos mais importantes ao longo de toda a minha vida! Ao infinitamente querido, sempre presente, verdadeiro amigo e tão amado irmão Fernando, que a vida toda se preocupou e cuidou de mim, desde que eu nasci, a ponto de se esquecer de si mesmo e pela sua imensa contribuição, como admirável Matemático, na Análise Sensorial. A essas três pessoas, poderosas em minha vida e que sempre foram o meu chão, minha eterna gratidão pela enorme e infinita paciência, tolerância e compreensão no decorrer de toda a minha tese e em toda a minha vida! Esta tese também é de vocês! Amo muito vocês!

Agradecimentos:

À minha orientadora, que acreditou em mim desde o início e me deu a oportunidade de realizar mais este sonho.

À Bióloga Didi, pelas valiosas informações e que desde o começo esteve sempre pronta a me ajudar.

A todo o pessoal da Microbiologia do ITAL que sempre cooperou comigo.

Aos membros da Banca, pelas sugestões que enriqueceram ainda mais o meu trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos onde foi possível realizar esse meu sonho.

A todo o pessoal da Biblioteca da FEA, pela paciência.

Ao Cosme da Pós Graduação, pela paciência e orientação.

Ao CNPq pela bolsa de estudos a mim concedida.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização de mais esta etapa em minha vida.

ÍNDICE

RESUMO _____	v
SUMMARY _____	vi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA _____	1
2. OBJETIVO GERAL _____	4
2.1. Objetivos Específicos _____	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	5
3.1. Hortaliças _____	5
3.1.1. Alface _____	5
3.1.2. Agrião _____	7
3.1.3. Rúcula _____	7
3.2. Frutas e Hortaliças Minimamente Processadas _____	12
3.2.1. Origem e Conceito _____	12
3.2.2. Demanda de Mercado, Objetivos e Mudança Comportamental _____	13
3.2.3. Qualidade dos Produtos Minimamente Processados _____	14
3.2.4. Alterações da Qualidade Nutricional dos Produtos Minimamente Processados _____	16
3.3. Alterações Fisiológicas e Bioquímicas nos Vegetais _____	17
3.3.1. Respiração _____	19
3.3.2. Amadurecimento e Senescência _____	20
3.3.3. Temperatura _____	21
3.3.4. Umidade Relativa _____	22
3.3.5. Alteração do Odor _____	22
3.3.6. Escurecimento Enzimático _____	22
3.3.7. Perda da Textura _____	23
3.4. Danos Mecânicos _____	23
3.5. Fatores Microbiológicos _____	24
3.5.1. Microbiota de Vegetais <i>in natura</i> _____	24
3.5.2. Microbiota de Vegetais Minimamente Processados _____	25
3.5.3. Fitopatógenos e Deterioração de Vegetais <i>in natura</i> _____	26
3.5.4. Fitopatógenos e Deterioração de Vegetais Minimamente Processados _____	28
3.5.5. Microrganismos Patogênicos Associados aos Vegetais <i>in natura</i> _____	29
3.5.6. Microrganismos Patogênicos Associados aos Vegetais Minimamente Processados _____	34
3.6. Cloro: Vantagens e Desvantagens _____	35
3.7. Ozônio Como Alternativa _____	38
3.7.1. Propriedades do Ozônio _____	39
3.7.2. Produção Comercial do Ozônio _____	41
3.7.3. Mecanismos de Ação _____	41

3.7.4. Efeitos da Utilização do Ozônio	42
3.7.5. Origem, Primeira Utilização e Reconhecimento do Ozônio como Agente Seguro (GRAS)	43
3.7.6. Aplicações do Ozônio	44
3.8. Análise Sensorial de Alimentos	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. Delineamento da Pesquisa	51
4.2. Amostras	51
4.3. Ozonizador	51
4.4. Etapas do Processamento Mínimo	52
4.5. Análises Microbiológicas	57
4.5.1. Preparação das Amostras para Análise Microbiológica	58
4.5.2. Contagem Total de Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos	58
4.5.3. Contagem de Coliformes Totais	58
4.5.4. Contagem de Bolores e Leveduras	58
4.5.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	59
4.6. Análise Sensorial	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. Efeito do Enxágüe em Água Corrente Sobre a Contaminação dos Diferentes Microrganismos Presentes nas Hortaliças	63
5.2. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Agrião Minimamente Processado Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes	66
5.3. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Alface Americana Minimamente Processada Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes	70
5.4. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Alface Crespa Minimamente Processada Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes	74
5.5. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Rúcula Minimamente Processada Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes	77
5.6. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas Diferentes Amostras Avaliadas	80
5.7. Comportamento Geral dos Microrganismos Contaminantes Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes	80
5.8. Análise Sensorial	87
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO	119

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química e nutricional de alface americana, alface crespa, agrião e rúcula_____	9
Tabela 2.	Terminologia descritiva para avaliação sensorial de hortaliças folhosas minimamente processadas_____	61
Tabela 3.	Contagem microbiana média inicial das amostras de hortaliças folhosas analisadas antes do enxágüe em água da rede de abastecimento (pré-enxágüe)_____	63
Tabela 4.	Contagem microbiana média de hortaliças folhosas imediatamente após o segundo enxágüe em água da rede de abastecimento – (pós-enxágüe)_____	64
Tabela 5.	Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em agrião minimamente processado antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração_____	67
Tabela 6.	Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em alface americana minimamente processada antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração_____	71
Tabela 7.	Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em alface crespa minimamente processada antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração_____	74
Tabela 8.	Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em rúcula minimamente processada antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração._____	77
Tabela 9.	Contagens médias de coliformes totais frente aos diferentes processos de sanitização e manutenção em temperatura de refrigeração_____	81
Tabela 10.	Contagens médias de bolores e leveduras frente aos diferentes processos de sanitização e manutenção em temperatura de refrigeração._____	82
Tabela 11.	Contagens médias de microrganismos aeróbios psicrotróficos frente aos diferentes processos de sanitização e manutenção em temperatura de refrigeração_____	84
Tabela 12.	Média das notas sensoriais de alface americana minimamente processada_____	87
Tabela 13.	Média das notas sensoriais de alface crespa minimamente processada_____	89
Tabela 14.	Média das notas sensoriais de agrião minimamente processado_____	90
Tabela 15.	Média das notas sensoriais de rúcula minimamente processada_____	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de equipamento para produção de água ozonizada.	52
Figura 2.	Fluxograma geral das etapas de processamento das hortaliças folhosas minimamente processadas	56
Figura 3.	Modelo de ficha de avaliação sensorial	62
Figura 4.	Contagens médias de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em hortaliças folhosas pré e pós-enxágüe	66
Figura 5.	População de coliformes totais em agrião minimamente processado sujeito a diferentes processos de sanitização	68
Figura 6.	População de bolores e leveduras em agrião minimamente processado sujeito a diferentes processos de sanitização	69
Figura 7.	População de microrganismos aeróbios psicrotróficos em agrião minimamente processado sujeito a diferentes processos de sanitização	70
Figura 8.	População de coliformes totais em alface americana minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	72
Figura 9.	População de bolores e leveduras em alface americana minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	72
Figura 10.	População de microrganismos aeróbios psicrotróficos em alface americana minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	73
Figura 11.	População de coliformes totais em alface crespa minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	75
Figura 12.	População de bolores e leveduras em alface crespa minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	75
Figura 13.	População de microrganismos aeróbios psicrotróficos em alface crespa minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	76
Figura 14.	População de coliformes totais em rúcula minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	78
Figura 15.	População de bolores e leveduras em rúcula minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	78
Figura 16.	População de microrganismos aeróbios psicrotróficos em rúcula minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização	79
Figura 17.	População média de coliformes totais frente aos diferentes processos de sanitização	81
Figura 18.	População média de bolores e leveduras frente aos diferentes processos de sanitização	83
Figura 19.	População média de microrganismos aeróbios psicrotróficos frente aos diferentes processos de sanitização	85
Figura 20.	Equipamento ozonizador	119
Figura 21.	Processamento mínimo	120

RESUMO

Frutas e hortaliças minimamente processadas são produtos comercializados previamente lavados, descascados, cortados ou fatiados, higienizados, embalados crus e armazenados sob refrigeração. O consumo de frutas e hortaliças minimamente processadas tem crescido significativamente nestas últimas décadas devido à busca por alimentos frescos e que ofereçam praticidade no preparo e consumo. Devido à excessiva manipulação durante seu processamento, prolongamento da vida-de-prateleira e ausência de grandes barreiras tecnológicas ao desenvolvimento de microrganismos (redução de atividade de água, alteração de pH, tratamento térmico, etc.), os riscos de contaminação tornam-se maiores. Os agentes mais utilizados na etapa de sanitização do processamento destes produtos têm sido os compostos clorados por sua eficiência e baixo custo. Diversos estudos apontam a formação de resíduos tóxicos deixados por estes compostos na água de lavagem bem como nos vegetais; além de requererem tempo de ação mínimo de 15 minutos, podendo ser considerado muito longo em processamentos industriais de grande escala. Assim sendo, o gás ozônio vem sendo apresentado como alternativa por seu alto poder sanitizante em baixas concentrações e em curto espaço de tempo, além de ausência residual. Foi avaliado o uso do ozônio na higienização de alface americana e crespa (*Lactuca sativa* L.), rúcula (*Eruca sativa* Mill.) e agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.), com concentrações de 0,5 , 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹ pelo tempo fixo de 1 minuto durante o processamento mínimo em comparação ao cloro com o objetivo de determinar o tratamento mais eficiente sob parâmetros microbiológicos e sensoriais. Os exames microbiológicos utilizados no presente estudo foram contagens totais de bactérias do grupo coliforme, bolores e leveduras, microrganismos aeróbios psicrotróficos e salmonela. O estudo revelou que o simples enxágüe em água corrente é capaz de reduzir a população da microbiota estudada das amostras em um ciclo logarítmico. O ozônio em concentrações de 1 e 1,5 mg.L⁻¹ mostrou desempenho superior ao cloro na redução das populações de coliformes totais e bolores e leveduras, apresentando ao final do período de análise contagens menores na mesma comparação. Os microrganismos psicrotróficos mantiveram baixa contagem nas hortaliças estudadas. De um modo geral, os diferentes tratamentos sanitizantes não possuíram influência relevante no desempenho sensorial das hortaliças.

SUMMARY

Minimally processed fruits and vegetables are sold already washed, peeled, cut or sliced, sanitized, packaged and cold-stored. Consumption of this kind of food has increased markedly in the last decades due to people interest for fresh and practice foods. High handling during its processing, increasing of its shelf-life and absence of remarkable technologic barriers against microorganisms (water activity, pH, thermal treatment, etc.) are factors that facilitate contamination risks in these products. Sanitizers commonly used are chlorine compounds due to their efficiency and low cost. However, several works report the production of toxic residues led by chlorine compounds in rinse water and vegetables. Moreover, the 15 minutes contact time required by chlorine compounds to their efficient activity can be considered long in a great-scale industrial processing. Thus the ozone gas becomes an alternative due to its sanitizing efficiency in low dosages, in a short time and with no residual toxic compounds. Ozone concentrations of 0,5, 1,0 and 1,5 mg.L⁻¹ per 1 minute was used as sanitizer during minimal processing of iceberg and curly lettuce (*Lactuca sativa* L.), rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) in comparison with chlorine to determine the most efficient treatment under microbiological and sensorial aspects. Total coliforms, moulds and yeasts and psychrotrophics counts were done. The data revealed that vegetables rinsed in tap water had reduced all of microorganisms' populations studied by 1 log. Ozone in concentrations 1.0 and 1.5 mg.L⁻¹ showed better performance than chlorine on total coliforms, moulds and yeasts populational reduction. The same performance was noticed in the last day of analysis. Sanitizing treatments had no relevant influence on vegetables' sensorial performance.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A procura do consumidor por alimentos considerados mais saudáveis associada à necessidade de alimentos que não exijam grande tempo de preparo fez crescer a demanda por alimentos denominados minimamente processados (HOOVER, 1997; RAGAERTA *et al.*, 2004).

O processamento mínimo de frutas e hortaliças é definido como sendo a operação que elimina as partes não-comestíveis dos mesmos, como cascas, talos, peles, sementes, sendo fatiados ou não, lavados e higienizados, centrifugados e secos, empacotados, armazenados sob refrigeração e prontos para o consumo (*ready-to-eat*). Os vegetais minimamente processados possuem baixo grau de processamento sendo mantidos a textura, o frescor, o sabor e as características originais do produto com qualidade e garantia de sanidade, oferecendo a praticidade além da conveniência ao consumidor (NGUYEN-THE & PRUNIER, 1989; VAROQUAUX & WILEY, 1994; YILDIZ, 1994; RODRIGUES *et al.*, 1999; SARZI & DURIGAN, 2002; GOULARTE *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos a indústria de minimamente processados representou movimento de 10 a 12 bilhões de dólares em 2000 (MARTÍN-DIANA, 2005). No Brasil as frutas e hortaliças minimamente processadas foram introduzidas em 1994, sendo o Estado de São Paulo responsável pelo movimento de 50 mil dólares em 1999 (RABELLO, 1999).

Os vegetais podem abrigar uma variedade de microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Clostridium botulinum* bem como microrganismos deteriorantes incluindo espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Erwinia* (BEUCHAT, 1996; THAYER & RAJKOWSKI, 1999).

Operações realizadas durante o processamento como corte, fatiamento ou descascamento e o intenso manuseio acarretam no aumento da taxa de respiração e transpiração do vegetal além de aumentar ainda mais a área de tecido danificado. Aliado a isso a disponibilidade de nutrientes provenientes dos sucos e exsudatos celulares permite o aumento do número de bactérias mesofílicas, acarretando na deterioração do tecido e redução da vida-de-prateleira dos vegetais minimamente processados em comparação ao vegetal intacto (PRIEPKE *et al.*, 1976; KING & BOLIN, 1989; GARG *et al.*, 1990; BARRIGA *et al.*, 1991; BRACKETT, 1992b; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; BEUCHAT, 1996; FAIN, 1996; De ROEVER, 1998; ZHANG *et al.*, 2005).

Nos últimos anos tem sido registrada uma ampla incidência de casos de doenças associadas à alimentação em diversos países (TAUXE *et al.*, 1997; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002; DEWAAL *et al.*, 2004; THOMAS *et al.*, 2003 *apud* QIANG *et al.*, 2005). Microrganismos patogênicos envolvidos em surtos por consumo de minimamente processados incluem *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e vírus da hepatite A (SINGH *et al.*, 2002). Fatores como o contato do vegetal com o solo, a realização das operações de processamento mínimo manualmente e o aumento da distância entre o processamento das hortaliças frescas e o seu consumo tornam maior a preocupação com a contaminação microbiológica (GARG *et al.*, 1990; BRACKETT, 1992b; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; FAIN, 1996).

Ponto importante para a segurança microbiológica dos alimentos minimamente processados é a etapa de sanitização. Os sanitizantes mais utilizados por seu baixo custo e eficiência são os compostos clorados, entretanto, de acordo com estudos mais recentes estes possuem a desvantagem da produção e permanência de resíduos potencialmente tóxicos nos alimentos como a cloramina e trihalometanos (LIANGJI, 1999) além de possuírem tempo para sua ação efetiva de no mínimo 15 minutos, conforme legislação (ESTADO DE SÃO

PAULO, 1999), o que pode ser considerado longo em produções de grande escala.

O ozônio surge como uma alternativa ao uso de compostos clorados, uma vez que concentrações menores em um curto espaço de tempo poderiam ser suficientes para se obter eficiência semelhante ou melhor na redução da contaminação microbiológica em operações de sanitização, além de ser um gás instável que se decompõe rapidamente em oxigênio molecular atóxico, não deixando resíduos nos alimentos.

Sob o ponto de vista microbiológico vegetais são considerados alimentos relativamente seguros, não obstante, existem condições extrínsecas e intrínsecas ao alimento que podem permitir ou favorecer o crescimento de microrganismos deterioradores e até patogênicos, ao mesmo tempo em que existem fatores que podem dificultar as alterações provocadas por estes microrganismos. Visando o aumento da segurança dos alimentos minimamente processados, além do prolongamento de sua vida-de-prateleira, o presente trabalho teve por objetivo estudar a eficiência da sanitização de hortaliças folhosas utilizando o ozônio como um composto alternativo ao cloro, sendo considerados os aspectos microbiológicos e sensoriais.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas, determinando seu desempenho em comparação aos compostos clorados sob o ponto de vista microbiológico e sensorial.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência de sanitização através do uso de diferentes concentrações de ozônio em comparação ao cloro no processamento mínimo de alface americana e crespa (*Lactuca sativa* L.), rúcula (*Eruca sativa* Mill.) e agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.), tendo como parâmetros a ação sobre a população de microrganismos aeróbios psicrotróficos, coliformes totais, salmonela, bolores e leveduras.
- Comparar o desempenho sensorial das amostras tratadas por diferentes concentrações de ozônio em relação às tratadas por composto clorado imediatamente após processamento mínimo e durante sua vida-de-prateleira.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hortaliças

3.1.1. Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça folhosa da família *Asteraceae* (INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX, 2006). As primeiras indicações de sua existência são de 4.500 anos a.C. em pinturas nos túmulos do Egito, região considerada como o possível centro de origem, sendo disseminada posteriormente pela Europa junto com a expansão do Império Romano (LINDQVIST, 1960; WHITAKER, 1974; RYDER, 1982). Já segundo CORRÊA (1984) e TRANI *et al.* (2005) a mesma é proveniente da Ásia, sendo introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVI. No mundo, é conhecida como: *lattuga*, na Itália; *laitue*, na França; *lattich*, na Alemanha; *lechuga*, na Espanha; *salata*, na Polônia; *latouche*, na Rússia; *lettuce*, na Inglaterra e *abirako*, no Japão (CORRÊA, 1984; TRANI *et al.*, 2005).

Planta herbácea de pequeno caule verde ou violáceo ao qual se prendem as folhas, da mesma cor, com a face voltada para o caule e as inferiores densas e moles, geralmente oblongas, inteiras, dentadas ou sinuosas; flores amarelas em capítulos; fruto com sementes muito pequenas. Possui folhas que podem ser lisas ou crespas, fechando-se ou não na forma de uma “cabeça” e que são comestíveis cruas em saladas e também cozidas de diversos modos; além de utilizadas como reguladoras do estômago e na decoração de pratos (CORRÊA, 1984; TRANI *et al.*, 2005). A coloração das plantas pode variar do verde-amarelado até o verde escuro e também roxa, dependendo do cultivar (TRANI *et al.*, 2005).

Segundo CORRÊA (1984), sob o ponto de vista botânico distinguem-se três variedades: *crispa*, *capitata* e *longifolia*, onde por elas distribuem-se todos os cultivares. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos acrescenta a

variedade *angustana* a estas anteriormente citadas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2006). A Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, através do programa de padronização de produtos hortifrutícolas, estabeleceu como classificação comercial as variedades Crespa, Lisa, Americana, Mimosa e Romana (TRANI *et al.*, 2005; CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE CAMPINAS, 2006; SECRETARIA DE AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006).

A alface é a hortaliça mais consumida nos Estados Unidos, tendo atingido, em 2005, o consumo *per capita* de 10 kg/ano além de ser o segundo maior produtor mundial, atrás somente da China e atingir, no mesmo ano, a produção de 3 milhões de toneladas (t) (PHILLIPS, 1996; GLASER *et al.*, 2001).

A alface é também considerada uma hortaliça folhosa importante na alimentação do brasileiro, assegurando à cultura expressiva importância econômica (FREIRE JR. *et al.*, 2002). Está entre as hortaliças mais vendidas para o consumo *in natura*, sendo muito utilizada no consumo doméstico, nas cadeias de *fast-foods* e restaurantes comerciais (KING JR. *et al.*, 1991; FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1996). É a sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido (BIASI *et al.*, 1991). A alface ocupou uma área de 4.026 hectares (ha) com produção nacional de 60.867 t em 1993, com o Estado de São Paulo respondendo por 45,6% da produção nacional (CAMARGO FILHO & MAZZEI, 1994). No ano de 1996, o Brasil produziu aproximadamente 311.888 t. Desse total, cerca de 173.000 t foram produzidas no Estado de São Paulo, ocupando uma área de 7.859 ha, gerando 6.360 empregos (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1996). O consumo médio *per capita* brasileiro em 1987 foi de 1,2 Kg/ano (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1989).

As áreas de cultivo da alface, inicialmente localizadas em cinturões verdes das grandes cidades do Estado de São Paulo e áreas serranas da Região

Sudeste, vêm se expandindo em direção ao planalto paulista e outras regiões. A alface do tipo americana vem sendo introduzida no Brasil, nos últimos anos, como consequência do aumento no número de redes de lanches prontos para consumo, uma vez que estas utilizam preferencialmente esta variedade (MELLO *et al.*, 2003). A composição química e nutricional da alface encontra-se na *Tabela 1*.

3.1.2. Agrião

O agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.) (INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX, 2006) é uma hortaliça da família *Brassicaceae*, originária da Europa e Ásia. Possui talo comprido e oco, com folhas verde-escuras ovaladas a levemente lanceoladas, de bordo total ou irregularmente recortado, flores branco-amareladas e sementes pardacentas, rugosas e pequenas (CORRÊA, 1984; WASHINGTON STATE DEPARTMENT OF ECOLOGY, 2006). Possui forte odor, é rico em vitaminas e é amplamente utilizado em saladas (MORRIS & JOBLING, 2004).

No mundo é conhecido como: *crescione di fontana*, na Itália; *cresson de fontaine*, na França; *berro de agua*, na Espanha; *brunnenkress*, na Alemanha; *water-cress* na Inglaterra e nos Estados Unidos (CORRÊA, 1984).

No Brasil, em 1996, foram produzidas 20.165 t do produto (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1996). Sua composição química e nutricional encontra-se na *Tabela 1*.

3.1.3. Rúcula

A rúcula (*Eruca sativa* Mill.) (INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX, 2006) é uma hortaliça da família das *Brassicaceae*, originária da Europa, Ásia Ocidental e África Setentrional. Possui caule de 20-60 cm, ereto; folhas espessas, flores brancacentas ou amareladas; sépalas eretas, estigma fendido em dois lobos

coniventes; cacho frutífero comprido, com pedicelos curtos e espessos; sementes globosas, lisas, em duas fileiras (CORRÊA, 1984).

No mundo, é conhecida como *rucola*, na Itália; *ranke*, na Alemanha; *rocket*, na Inglaterra; *raquelle*, na França e *jaramago*, na Espanha (CORRÊA, 1984). Sua composição química e nutricional encontra-se na *Tabela 1*.

Tabela 1. Composição química e nutricional de alface americana, alface crespa, agrião e rúcula.

Nutrientes	Unidade	Alface Americana (por 100 g)	Alface Crespa (por 100 g)	Agrião (por 100 g)	Rúcula (por 100 g)
Água	g	95,64	95,07	95,11	91,7
Energia	kcal	14	15	11	25
Energia	kJ	58	61	46	104
Proteína	g	0,90	1,36	2,30	2,58
Gorduras Totais	g	0,14	0,15	0,10	0,66
Cinzas	g	0,36	0,62	1,20	1,40
Carboidratos	g	2,97	2,79	1,29	3,65
Fibras totais	g	1,2	1,3	0,5	1,6
Açúcares totais	g	1,97	0,78	0,20	2,05
Sacarose	g	0,05	0,00		
Glicose (dextrose)	g	0,91	0,36		
Frutose	g	1,00	0,43		
Lactose	g	0,00	0,00		
Maltose	g	0,00	0,00		
Galactose	g	0,00	0,00		
Amido	g	0,00	0,00		
Minerais					
Cálcio (Ca)	mg	18	36	120	160
Ferro (Fe)	mg	0,41	0,86	0,20	1,46
Magnésio (Mg)	mg	7	13	21	47
Fósforo (P)	mg	20	29	60	52
Potássio (K)	mg	141	194	330	369
Sódio (Na)	mg	10	28	41	27
Zinco (Zn)	mg	0,15	0,18	0,11	0,47
Cobre (Cu)	mg	0,025	0,029	0,077	0,076
Manganês (Mn)	mg	0,125	0,250	0,244	0,321
Selênio (Se)	µg	0,1	0,6	0,9	0,3
Vitaminas					
Vitamina C (ác. ascórbico)	mg	2,8	18,0	43,0	15
Tiamina	mg	0,041	0,070	0,090	0,044
Riboflavina	mg	0,025	0,080	0,120	0,086
Niacina	mg	0,123	0,375	0,200	0,305
Ácido Pantotênico	mg	0,091	0,134	0,310	0,437
Vitamina B-6	mg	0,042	0,090	0,129	0,073
Folato total	µg	29	38	9	97

Tabela 1. Composição química e nutricional de alface americana, alface crespa, agrião e rúcula. (continuação)

Nutrientes	Unidade	Alface Americana (por 100 g)	Alface Crespa (por 100 g)	Agrião (por 100 g)	Rúcula (por 100 g)
Vitaminas (continuação)					
Ácido Fólico	µg	0	0	0	0
Folato	µg	29	38	9	97
Vitamina B-12	µg	0,00	0,00	0,00	0,00
Vitamina A	UI	502	7405	4700	2373
Retinol	µg	0	370	0	0
Vitamina E (alfa-tocoferol)	mg	0,18	0,29	1,00	0,43
Tocoferol (beta)	mg	0,00	0,00		
Tocoferol (gama)	mg	0,09	0,37		
Tocoferol (delta)	mg	0,00	0,01		
Vitamina K	µg	24,1	173,6	250,0	108,6
Lipídios					
Total de ácidos graxos saturados	g	0,018	0,020	0,027	0,049
4:0	g	0,000	0,000	0,000	0,000
6:0	g	0,000	0,000	0,000	0,000
8:0	g	0,000	0,000	0,000	0,000
10:0	g	0,000	0,000	0,000	0,000
12:0	g	0,000	0,000	0,000	0,000
14:0	g	0,000	0,000	0,000	0,000
16:0	g	0,016	0,018	0,024	0,072
18:0	g	0,002	0,002	0,003	0,004
Total de ácidos graxos monoinsaturados	g	0,006	0,006	0,008	0,049
16:1	g	0,001	0,002	0,002	0,001
18:1	g	0,004	0,005	0,006	0,046
20:1	g	0,000	0,000	0,000	0,000
22:1	g	0,000	0,000	0,000	0,000
Total de ácidos graxos poliinsaturados	g	0,074	0,082	0,035	0,319
18:2	g	0,021	0,024	0,012	0,130
18:3	g	0,052	0,058	0,023	0,170
18:4	g	0,000	0,000	0,000	0,000
20:4	g	0,000	0,000	0,000	0,002

Tabela 1. Composição química e nutricional de alface americana, alface crespa, agrião e rúcula. (continuação)

Nutrientes	Unidade	Alface Americana (por 100 g)	Alface Crespa (por 100 g)	Agrião (por 100 g)	Rúcula (por 100 g)
Lipídios (continuação)					
20:5 n-3	g	0,000	0,000	0,000	0,000
22:5 n-3	g	0,000	0,000	0,000	0,000
22:6 n-3	g	0,000	0,000	0,000	0,000
Colesterol	mg	0	0	0	0
Fitosteróides	mg	10	38		
Aminoácidos					
Triptofano	g	0,009	0,009	0,030	
Treonina	g	0,025	0,059	0,133	
Isoleucina	g	0,018	0,084	0,093	
Leucina	g	0,025	0,079	0,166	
Lisina	g	0,024	0,084	0,134	
Metionina	g	0,005	0,016	0,020	
Cistina	g	0,005	0,016	0,007	
Fenilalanina	g	0,023	0,055	0,114	
Tirosina	g	0,007	0,032	0,063	
Valina	g	0,024	0,070	0,137	
Arginina	g	0,015	0,071	0,150	
Histidina	g	0,009	0,022	0,040	
Alanina	g	0,025	0,056	0,137	
Ácido Aspártico	g	0,125	0,142	0,187	
Ácido Glutâmico	g	0,194	0,182	0,190	
Glicina	g	0,015	0,057	0,112	
Prolina	g	0,010	0,048	0,096	
Serina	g	0,025	0,039	0,060	
Outros					
Cafeína	mg	0	0	0	0
Teobromina	mg	0	0	0	0
Beta-caroteno	µg	299	4443	2820	1424
Alfa-caroteno	µg	4	0	0	0
Beta-criptoxantina	µg	0	0	0	0
Licopeno	µg	0	0	0	0
Luteína + zeaxantina	µg	277	1730	5767	3555

Fonte: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2004.

OBS: Localizações em branco significam análises não realizadas.

3.2. Frutas e Hortaliças Minimamente Processadas

3.2.1. Origem e Conceito

A atividade de processamento mínimo de frutas e hortaliças teve início nos Estados Unidos quando, em 1938, saladas embaladas podiam ser encontradas em quitandas e pequenos mercados (IFPA, 1999 *apud* MORETTI & MACHADO, 2006). Na década de 70 surgiram no mesmo país um volume importante de vegetais pré-processados, reunindo praticidade e conveniência. No Brasil, a produção e comercialização de produtos minimamente processados tiveram início em 1996, principalmente nos estados do sudeste (PUSCHMANN *et al.*, 2006).

Os vegetais minimamente processados englobam todos aqueles produtos frescos submetidos a pequeno processamento que incluem seleção, lavagem, descascamento, corte, fatiamento, sanitização e empacotamento, ou seja, são preparados prontos para serem consumidos, porém em estado semelhante aos vegetais frescos, trazendo como conseqüências a melhor aparência do alimento e a redução do tempo de preparo para o consumidor final (SHEWFELT, 1987; SENESI, 1993; VAROQUAUX & WILEY, 1994; WILEY, 1994; YILDIZ, 1994; SARANTÓPOULOS, 1997; CHITARRA, 1998; RODRIGUES *et al.*, 1999; RIVA *et al.*, 2001). Para ROVERSI & MASSON (2004) e PINHEIRO *et al.* (2005) o processamento mínimo pode ser descrito como sendo a manipulação, preparo, embalagem e distribuição de produtos agrícolas que, embora modificados fisicamente, continuam apresentando as mesmas características do produto *in natura* como frescor, sabor e nutrientes, não passando por nenhum tipo de tratamento térmico e, portanto, com os tecidos vegetais ainda ativos metabolicamente. Além disso as operações a que esses vegetais são submetidos para serem classificados como minimamente processados contribuem para uma maior agregação no seu valor.

3.2.2. Demanda de Mercado, Objetivos e Mudança Comportamental

Nos Estados Unidos, onde surgiram os vegetais minimamente processados, esse mercado se expandiu chegando a alcançar, em 2003, US\$19 bilhões e continua crescendo em todo o mundo para atender a demanda por vegetais frescos, mas que também sejam “prontos para o consumo” (*ready-to-eat*). Um exemplo disso é que mesmo sendo mais recente na Europa, sua produção, na França, saltou de 400 t em 1985 para 35.000 t em 1989 (NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; JUNQUEIRA & LUENGO, 2000).

Seguindo essa tendência muitos consumidores brasileiros resolveram utilizar pratos semi-prontos e vegetais pré-cortados. Os supermercados estão ampliando cada vez mais as seções deste tipo de produto. Segundo dados da Consultoria Nielsen, no Brasil este nicho de mercado começou a ser explorado em 1994 e, em apenas um ano, cresceu 68,9% em volume consumido no varejo; em 1996, movimentou cerca de R\$ 400 milhões em vendas; e em 1998, R\$ 450 milhões. Na grande São Paulo, de 1996 a 1999, foi verificado aumento no varejo de 200% na oferta de produtos minimamente processados. Os supermercados em São Paulo vendiam em torno de 4 milhões de dólares de produtos minimamente processados mensalmente (JORNAL DO BRASIL, 1997; MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 1999).

O objetivo do mercado de frutas e hortaliças minimamente processadas é proporcionar ao consumidor tais produtos de forma prática para o manuseio, preservando a maior semelhança possível ao produto fresco e com uma maior vida-de-prateleira, devendo os mesmos ser produtos seguros do ponto de vista sanitário, mantendo as qualidades nutricionais e sensoriais (SHEWFELT, 1987; SARANTÓPOULOS, 1997; CHITARRA, 1998).

Nas últimas décadas o consumo de alimentos processados aumentou consideravelmente, o consumidor vem apresentando cada vez maior consciência

na escolha de sua alimentação, porém com menor tempo disponível para preparar refeições saudáveis (BURNS, 1995). Associado a isso um número cada vez maior de pessoas, pela percepção crescente da importância nutricional e impacto na saúde, buscam uma alimentação com maior ingestão de hortaliças, frutas e cereais, com o objetivo de redução dos riscos de doenças cardíacas e incidência de câncer (BALDWIN *et al.*, 1995; CASTELL, 2004). A crescente colocação da mulher no mercado de trabalho além da administração e execução das tarefas domésticas que continuam, na maioria das vezes, sob sua responsabilidade, vem a ser mais um fator que colabora para um maior consumo de produtos mais práticos que necessitem de um menor tempo para o seu preparo (SILVA *et al.*, 2004). Todos estes fatores são responsáveis pelas mudanças que vêm ocorrendo quanto aos hábitos de compra, conservação, preparo e consumo dos alimentos. Como resultado, o mercado e a demanda por frutas e hortaliças minimamente processadas têm aumentado rapidamente, proporcionando o surgimento de produtos convenientes, ou seja, produtos frescos que podem ser preparados e consumidos em pouco tempo, acarretando numa mudança comportamental em relação aos padrões de consumo de alimentos de origem vegetal (BURNS, 1995; JAY, 2005).

3.2.3. Qualidade dos Produtos Minimamente Processados

A qualidade de frutas e hortaliças corresponde ao conjunto de características que as tornam aceitáveis e apreciadas como alimentos, sendo elas: aparência, sabor, odor, textura e valor nutritivo, dando maior ênfase, no caso dos produtos minimamente processados, à aparência, forma e cor, além da ausência de defeitos no produto (SHEWFELT, 1987; CHITARRA & CHITARRA, 1990) e os principais parâmetros para a avaliação de qualidade pelo consumidor são suas propriedades visuais, como o escurecimento, o amarelecimento de folhas verdes e o murchamento do vegetal (BOLIN & HUXSOLL, 1991). Tais deteriorações podem

ocorrer pelo rompimento do tecido vegetal ocasionado pela respiração tecidual e também por ação microbiana (KING JR. *et al.*, 1991; KING & BOLIN, 1989).

Após a colheita, os vegetais mantêm a respiração celular, cujos componentes formados podem ser utilizados na biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos, componentes aromáticos e pigmentos, que são importantes na determinação de sua qualidade. A respiração está diretamente associada à conservação dos vegetais, sendo que a partir do momento em que o tecido é danificado por descascamento e corte, a razão de respiração aumenta consideravelmente (SKURA & POWRIE, 1995).

A presença de *off-flavours* durante a manutenção dos minimamente processados sob refrigeração pode se dar além do metabolismo fermentativo do tecido vegetal, também devido a alguns microrganismos, como as bactérias ácido-láticas, que podem vir acompanhadas da produção de ácidos láctico e acético, como *Leuconostoc* spp. e *Lactobacillus* spp. Outros microrganismos que também podem provocar *off-flavours* são as leveduras do gênero *Candida*, através da produção de CO₂, etanol, ácidos orgânicos e ésteres voláteis (FLEET, 1992).

Para serem parcialmente processadas, frutas e hortaliças precisam apresentar excelente qualidade, o que equivale à ausência de danos mecânicos. Os rompimentos no tecido induzem a atividades fisiológicas, reações bioquímicas, além de infecções por patógenos, resultando na deterioração do produto (HUXSOLL & BOLIN, 1989).

3.2.4. Alterações da Qualidade Nutricional dos Produtos Minimamente Processados

Os vegetais são considerados importantes fontes de nutrientes, uma vez que grande parte das vitaminas e minerais provém de frutas e hortaliças, particularmente as vitaminas A, C e ácido fólico, sendo as vitaminas do complexo B (niacina, riboflavina e tiamina) presentes em menor quantidade (LUND, 1977; KLEIN & PERRY, 1982).

Após a colheita podem ocorrer nos vegetais perdas nutricionais decorrentes das reações metabólicas que conduzem a uma redução no conteúdo dos nutrientes, tais como vitaminas, proteínas e lipídios, entre outros, cujos efeitos podem acabar reduzindo o valor comercial do produto (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

A estabilidade de vitaminas em vegetais pode ser afetada por diversos fatores que incluem o calor, luz, oxigênio, taxa de perda de água no produto e pH. Cada nutriente difere consideravelmente quanto à sua susceptibilidade a diversos fatores, pois enquanto a niacina é marcadamente estável em relação à maioria das condições encontradas num processamento, inclusive ao calor, o ácido ascórbico é extremamente lábil, sendo a variação de sua concentração usada em trabalhos científicos como parâmetro para avaliação da perda nutricional em hortaliças minimamente processadas submetidas a embalagem em atmosferas modificadas (FENNEMA, 1977; KLEIN, 1987; BARTH & ZHUANG, 1996; MARTÍN-DIANA, 2005).

Em geral a concentração de vitamina C diminui com o amadurecimento da planta, sendo a taxa de perda variável de acordo com o produto. A perda do ácido ascórbico tem sido atribuída a inúmeras enzimas, dentre elas, a polifenoloxidase (MATTHEWS *et al.*, 1974; FENNEMA, 1977; KLEIN, 1987).

De modo geral sabe-se que a execução do processamento mínimo acelera a degradação nutricional destes alimentos (BARTH & ZHUANG, 1996; MARTÍN-

DIANA *et al.*, 2005). Todos os processos de ruptura dos tecidos (corte, descascamento) são claramente destrutivos, pois acarretam na conseqüente ruptura celular resultando em rápida perda de vitamina C (FENNEMA, 1977; KLEIN, 1987).

Outro ponto a ser considerado nas perdas nutricionais são as etapas de toalete, corte ou fatiamento dos vegetais que ocorrem durante o processamento. No caso do toalete há o descarte de partes da planta onde vitaminas podem estar presentes em maior quantidade (KLEIN, 1987). Já no caso de corte ou fatiamento, tomando como exemplo o espinafre, vegetal rico em vitamina C, este sofre 50% de perda desta vitamina em dois dias a 20°C quando fatiado (FENNEMA, 1977).

Em virtude das vitaminas do complexo B serem estáveis em condições normais de armazenamento e temperatura e não estarem presentes em grande quantidade em frutas e hortaliças, tem se dado pouca atenção ao seu estudo (LUND, 1977; KLEIN, 1987).

São escassos os trabalhos que tratam sobre os efeitos dos sanitizantes como cloro e ozônio sobre a composição nutricional dos minimamente processados. Uma vez que a vitamina C possui propriedades antioxidantes, pode-se inferir que processos de sanitização à base de compostos com poder oxidante como cloro e ozônio provavelmente possam agir na redução da concentração de vitamina C dos minimamente processados.

3.3. Alterações Fisiológicas e Bioquímicas nos Vegetais

Logo após a colheita e em todo o período do pós-colheita, frutas e hortaliças passam por uma série de transformações endógenas resultantes do próprio metabolismo, acarretando em diversas modificações no tecido vegetal, o que aumenta sua susceptibilidade a danos mecânicos e ataques de patógenos, refletindo em várias mudanças nas suas características, estas sendo notadas

inclusive e principalmente, quando os vegetais são processados, tais como: textura, cor, sabor e aroma (CHITARRA & CHITARRA, 1990; VAROQUAUX & WILEY, 1994).

Imediatamente após a colheita inicia-se o processo natural de deterioração dos vegetais devido a alterações fisiológicas, bioquímicas, microbiológicas e mecânicas. Os produtos minimamente processados, em especial, são mais sensíveis à deterioração que os produtos *in natura* devido a etapas como descascamento, corte e trituração. No caso de vegetais com casca, além desta ser um tecido protetor é também uma barreira física que impede inicialmente a invasão microbiana. O corte do tecido vegetal leva à descompartimentalização celular, desorganizando sua estrutura natural, havendo o rompimento de suas células, liberando enzimas nelas contidas, que originam modificações bioquímicas como a alteração do odor característico, a perda da textura original e o desenvolvimento da coloração escura, tendo como enzima importante na ocorrência deste último fenômeno a polifenoloxidase quando na presença de oxigênio. O descascamento e corte de frutas e hortaliças libera exsudatos celulares que servem de nutrientes, favorecendo a aceleração no desenvolvimento de microrganismos, que podem ser deterioradores e patogênicos, além de posterior colonização destes nos tecidos vegetais. Aliado a isso, o tecido vegetal ainda está vivo, respirando e sofrendo numerosas reações bioquímicas, tornando-os mais perecíveis que o produto não processado (SHEWFELT, 1986; BRACKETT, 1987; HUXSOLL & BOLIN, 1989; KING JR. & BOLIN, 1989; BOLIN & HUXSOLL, 1991; VAROQUAUX & WILEY, 1994; CHITARRA, 1998; PILON, 2003; CORBO *et al.*, 2006).

Outro fator a ser considerado é o excessivo manuseio do produto, quando processado, aumentando a susceptibilidade à invasão microbiana, além de utensílios e equipamentos utilizados no processamento poderem se constituir em fontes de contaminação, fornecendo condições para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos (CHITARRA, 1998; PILON, 2003).

Tanto em vegetais frescos como nos minimamente processados os principais fatores que devem ser levados em conta são os fatores fisiológicos, que incluem reações químicas e bioquímicas, além de condições ambientais adversas e de estresse durante o armazenamento do produto, fatores mecânicos e microbiológicos (CHITARRA & CHITARRA, 1990; SKURA & POWRIE, 1995; AHVENAINEN, 1996).

3.3.1. Respiração

A respiração vegetal consiste na oxidação de açúcares e ácidos orgânicos para a obtenção da energia, sendo primordialmente um processo oxidativo aumentando os níveis de dióxido de carbono (CO_2) e água com liberação de energia, sendo essa energia química requerida para a realização dos vários processos essenciais ao ser vivente. A ruptura dos tecidos vegetais acarreta no aumento da velocidade de respiração e, em alguns casos, na produção do etileno. A taxa respiratória dos alimentos minimamente processados é aumentada de 3 a 7 vezes em relação ao tecido intacto, o que se traduz em rápido consumo de oxigênio (VAROQUAUX & WILEY, 1994), havendo a diminuição do teor de O_2 disponível. Sob condições anaeróbicas, a via glicolítica substitui o ciclo de Krebs como a principal fonte de energia. O ácido pirúvico é então descarboxilado para formar acetaldeído e, a partir deste, CO_2 e etanol, resultando no desenvolvimento de sabor indesejável, rompimento e escurecimento dos tecidos (KADER, 1986). Além disso a liberação de etileno, entre outros compostos, durante o fenômeno respiratório, conduz mais rapidamente os vegetais à senescência e afeta alguns de seus atributos de qualidade, como firmeza e cor (BLEINROTH, 1973; WATADA *et al.*, 1990).

Quanto mais rápido o produto respira e amadurece, maior é a quantidade de calor gerado. Ocorrem então as perdas, uma vez que a vida-de-prateleira varia inversamente à taxa de evolução do calor produzido, portanto, as perdas são

maiores e a longevidade do produto menor quando este é mantido à temperatura ambiente com temperatura elevada e sem refrigeração após a colheita (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

O processo de respiração está associado ao da transpiração, onde ocorre a perda de água do vegetal, considerada importante causa na deterioração dos vegetais minimamente processados, uma vez que resulta no seu murchamento e amolecimento, acarretando respectivamente, em perdas na aparência e textura do produto (KADER, 1986).

3.3.2. Amadurecimento e Senescência

Após a colheita, os vegetais sofrem uma série de transformações endógenas que podem ser indicativas do processo de amadurecimento e posterior senescência.

Durante a senescência reações degradativas tornam-se maiores do que as reações biossintéticas e há diversas alterações nos tecidos vegetais, como a quebra de lipídios e a desorganização das membranas celulares, o que acarreta em conseqüente enfraquecimento da estrutura celular, tornando o tecido vegetal muito susceptível ao processo de deterioração (WATADA *et al.*, 1990).

O etileno, que é produzido em quase todas as células de plantas superiores, possui numerosos efeitos no crescimento, desenvolvimento, amadurecimento, senescência, e portanto, na vida-de-prateleira de frutas e hortaliças. Mesmo em baixas concentrações é capaz de induzir uma série de respostas fisiológicas, como a síntese e ativação de enzimas que hidrolisam a parede celular, ocasionando perda de firmeza no tecido vegetal, além de estar relacionado com o incremento da descoloração da cor verde em hortaliças folhosas, devido provavelmente, ao aumento da atividade da clorofilase, além de outras desordens fisiológicas, levando os vegetais minimamente processados à senescência com perda da qualidade comestível e conseqüente perda na comercialização. O mecanismo de

indução na produção de etileno ainda não é bem conhecido, entretanto, sua produção por frutas e hortaliças processadas pode ser incrementada em até 20 vezes quando comparada com o vegetal intacto (FERRI, 1985; WATADA, 1986; CHITARRA & CHITARRA, 1990; VAROQUAUX & WILEY, 1994; SALTVEIT, 1999).

Sabe-se que o oxigênio é necessário para a sua produção e ação, uma vez que em condições anaeróbicas, a produção do etileno é inibida. Em elevadas concentrações de CO₂, entretanto, pode haver aumento na sua produção devido à ocorrência de danos fisiológicos no tecido (WATADA, 1986; CHITARRA & CHITARRA, 1990).

O transporte do etileno ocorre tanto em tecidos vegetais vivos ou mortos. Por este fato os vegetais devem ser colhidos na maturidade adequada para apresentar boas condições de manuseio e armazenamento (FERRI, 1985; CHITARRA & CHITARRA, 1990; SALTVEIT, 1999).

3.3.3. Temperatura

Em geral, os produtos mantidos sob temperatura elevada têm seu metabolismo ativado, com elevada taxa de respiração e conseqüente redução de sua vida pós-colheita. A elevada taxa de respiração, em geral, conduz à redução nos teores de açúcares, sendo esse um fator negativo de qualidade. Além dos açúcares, outros constituintes, como vitaminas, também podem ser afetados pela temperatura de manutenção do produto (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

Como o envelhecimento e a deterioração de frutas e hortaliças são processos contínuos pós-colheita, cuidados na manutenção de uma temperatura precisa e de condições adequadas de manuseio são importantes para a sua conservação (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

O uso de refrigeração para manutenção de produtos tropicais pode ocasionar o fenômeno da injúria pelo frio (*chilling*), que do mesmo modo que os

danos causados por elevadas temperaturas, pode ocasionar descoloração interna, colapso dos tecidos, aumento na susceptibilidade a doenças, qualidade reduzida, além de ocasionar mudanças bioquímicas. Isso significa que o benefício maior pelo frio, que seria a redução da atividade metabólica, não pode ser atingido, bem como se torna necessário o controle acurado da temperatura para manter a segurança do produto sem o risco de danos (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

3.3.4. Umidade Relativa

A umidade relativa excessivamente baixa pode provocar o murchamento rápido de hortaliças folhosas enquanto que valores elevados podem favorecer o desenvolvimento de patógenos. A umidade relativa ótima para a manutenção da maioria dos produtos perecíveis gira em torno de 85 a 95% (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

3.3.5. Alteração do Odor

O odor alterado encontrado em hortaliças está intimamente relacionado com a oxidação de ácidos graxos catalisada por lipoxidases, produzindo aldeídos e cetonas responsáveis pela alteração do odor (VAROQUAUX & WILEY, 1994).

3.3.6. Escurecimento Enzimático

Durante o corte, fatiamento ou outros procedimentos que levem a danos no tecido vegetal, são liberadas enzimas que, em contato com substratos celulares, promovem uma das mais importantes reações bioquímicas que levam ao escurecimento do tecido vegetal. Esta reação é ocasionada pela oxidação dos compostos fenólicos catalisada pela enzima polifenoloxidase. Esta enzima, na presença de oxigênio, participa da transformação dos fenólicos em quinonas

coloridas, que participam, posteriormente, das reações de polimerização e dão origem às melonoidinas, responsáveis pela coloração marrom-escuro nos vegetais (DORANTES-ALVAREZ & CHIRALT, 2000; MARTINS & EMPIS, 2006).

A degradação da clorofila ocorre concomitantemente ao escurecimento enzimático dos tecidos vegetais. O pigmento pode ser decomposto por diversas enzimas como a clorofiloxidase e clorofilase, contribuindo na alteração de cor do tecido vegetal quando ocorrem injúrias mecânicas (VAROQUAUX & WILEY, 1994).

3.3.7. Perda da Textura

A variação da textura em vegetais pode ser resultado da perda excessiva de água, que acarreta na diminuição da pressão de turgescência das células, podendo ocorrer por alta transpiração ou decomposição da parede celular. Neste último caso, a degradação deve-se à ação de proteases e de enzimas pectinolíticas dos compostos da parede celular. Estas mudanças ocorrem durante a fase final do amadurecimento e se prolongam com maior intensidade durante a senescência. Estas alterações são consideravelmente aceleradas nos produtos minimamente processados, em especial quando danificados pelo corte (KING & BOLIN, 1989; WILLS *et al.*, 1989; VAROQUAUX & WILEY, 1994).

3.4. Danos Mecânicos

Danos mecânicos podem ocorrer em qualquer ponto da cadeia de comercialização, desde a colheita até o consumo, sob a forma de abrasões, cortes, rupturas ou amassamentos, profundos ou superficiais. Na colheita pode haver abrasão resultante da fricção entre os vegetais ou entre a parede da caixa; cortes por objetos pontiagudos e amassamentos por impacto ou compressão, sendo que a evolução do etileno da parte ferida pode desencadear o

amadurecimento tanto entre os frutos danificados como nos sadios que estiverem próximos, quando mantidos no mesmo local (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

Durante o processamento de frutas e hortaliças, etapas necessárias como corte, descascamento e outras ações físicas causam danos aos tecidos acarretando em maiores taxas de respiração e produção de etileno e conseqüentemente, maiores alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas, muitas delas responsáveis pela mudança de cor, escurecimento, odor, textura e qualidade nutricional do produto (HUXSOLL & BOLIN, 1989; BRECHT, 1995).

As reações de escurecimento podem ser provocadas pela degradação dos lipídios da membrana devido a ferimentos no tecido vegetal durante o processamento. O escurecimento representa um dos principais fatores limitantes à vida útil dos produtos minimamente processados, desvalorizando assim seu valor comercial (BURNS, 1995; DAREZZO *et al.*, 2000).

As lesões no tecido vegetal resultam na morte de células externas conferindo uma aparência desagradável ao produto, acarretando em prejuízo durante a avaliação de sua qualidade (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

3.5. Fatores Microbiológicos

3.5.1. Microbiota de Vegetais *in natura*

O ataque por microrganismos é causa importante nas perdas pós-colheita dos produtos perecíveis, incluindo-se aí tanto os vegetais crus como os minimamente processados (CHITARRA & CHITARRA, 1990). Frutas e hortaliças apresentam atividade de água (A_w) em torno de 0,95 ou maior, o que facilita o crescimento de muitos microrganismos (BRACKETT, 1994; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; BRACKETT, 1999).

A microbiota característica dos vegetais *in natura* é formada por microrganismos provenientes do próprio solo, representada principalmente por bactérias Gram-negativas como as dos gêneros *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Enterobacter*, havendo também a presença de bactérias Gram-positivas como *Bacillus* spp. além de bolores e leveduras (CANTWELL, 1992; BRACKETT, 1994).

O acesso de microrganismos patogênicos aos vegetais se dá quando os mesmos são expostos, ainda no campo, aos riscos de fertilização com dejetos humanos e de outros animais e à irrigação com água poluída, contribuindo para a presença de agentes etiológicos de diversas enfermidades infecto-contagiosas e parasitárias que normalmente estariam ausentes (MÜLLER, 1981; HOBBS, 1986; CHAPMAN, 1995; WEI *et al.* 1995; BEUCHAT, 1996; GAGLIARDI & KARNS, 2000). Deste modo frutas e hortaliças frescas podem ser colonizadas por diversos patógenos como bactérias, vírus, parasitas e fungos (BARRIGA *et al.*, 1991; KING JR. *et al.*, 1991; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; BEUCHAT, 1996; AMAHMID *et al.*, 1999; THAYER & RAJKOWSKI, 1999; SEYMOUR & APPLETON, 2001; SILVA *et al.*, 2005). A proliferação destes patógenos, entretanto, pode ser reprimida pela microbiota epífita do próprio vegetal, a qual exercendo pressão competitiva, dificulta o crescimento dos primeiros (BARRIGA *et al.* 1991).

3.5.2. Microbiota de Vegetais Minimamente Processados

No caso dos minimamente processados, como nos vegetais *in natura*, o ambiente é o primeiro fator contaminante. O solo, geralmente rico em bactérias e fungos, pode contaminar os vegetais diretamente ou tais agentes podem ser transportados pelo vento, insetos ou pela chuva elevando sua carga microbiana (BRACKETT, 1994). Durante a colheita e processamento, devido à má higiene na manipulação e eventuais danos provocados, pode haver contaminação cruzada e liberação de exsudato celular, o que permite o crescimento microbiano nos equipamentos e nos próprios alimentos. Tratamentos como cortes, que expõem

grandes superfícies, podem provocar proliferação microbiana 6 a 7 vezes superior em relação aos alimentos intactos. Mesmo microrganismos não deteriorantes, em outras condições, podem ocasionar a degradação do produto após a perda da proteção natural que as cascas representam (BRACKETT, 1994; BEUCHAT, 1996).

As espécies microbianas encontradas nas frutas e hortaliças minimamente processadas são comumente as mesmas encontradas no campo ou após o cultivo; provavelmente originadas da microflora epífita dos vegetais crus. Podendo a microbiota variar de acordo com o clima, práticas de cultivo, entre outros fatores (ERCOLANI, 1976; BRACKETT, 1994). Foram relatadas em minimamente processados as bactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola* e *Enterobacter agglomerans* (SETER et al., 1987; KHAN et al., 1992) além de bactérias ácido-láticas do gênero *Leuconostoc* spp., bactérias pectinolíticas dos gêneros *Xanthomonas* spp. e *Flavobacterium* spp. e leveduras (NGUYEN-THE & CARLIN, 1994).

3.5.3. Fitopatógenos e Deterioração de Vegetais *in natura*

Frutas e hortaliças possuem características químicas diferentes onde as primeiras apresentam maiores quantidades de açúcar e pH mais ácido, o que desfavorece o crescimento bacteriano, favorecendo bolores e leveduras, enquanto que as últimas apresentam elevada quantidade de água e nutrientes além de pH neutro, o que permite o desenvolvimento preponderante de bactérias (BRACKETT, 1994).

As bactérias exercem importante papel na deterioração de hortaliças cuja microflora, quando não processada, é dominada por bactérias pectinolíticas como *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. além de alguns bolores, que possuem a capacidade de elaborar as mesmas enzimas, ocasionando a deterioração dos vegetais e influenciando na sua qualidade no pós-

colheita. Estas enzimas têm a capacidade de degradar celulose além de pectina, provocando o amolecimento do tecido vegetal e produzindo odor desagradável e aparência úmida, sendo o gênero *Erwinia* o principal responsável pela podridão mole bacteriana comum nas hortaliças. O gênero *Pseudomonas* causa sintomas similares aos da *E. carotovora*, porém, com crescimento rápido e ocorrente em temperaturas de refrigeração. Bacilos e clostrídios também podem crescer, porém, lentamente e abaixo de 10°C (KING & BOLIN, 1989; BARRIGA *et al.*, 1991; KING JR *et al.*, 1991; BRACKETT, 1994; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; BEUCHAT, 1996; VAROQUAUX & WILEY, 1994; THAYER & RAJKOWSKI, 1999; LANDGRAF, 2004; FRANCO & LANDGRAF, 2004).

Hortaliças podem também sofrer alterações devido à presença de vírus, como o causador do mosaico da alface, acarretando na descoloração das folhas além de amarelecimento do tecido (LIPTON & RYDER, 1989).

Em temperaturas de refrigeração, os fungos capazes de crescer e provocar degradação em hortaliças são: *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Thamnidium* sp. e *Cladosporium* sp. (BRACKETT, 1994).

Já nas frutas os fungos são os mais envolvidos na deterioração, onde numerosos tipos têm sido associados a doenças do pós-colheita, produzindo um número variável de efeitos deteriorativos que incluem descoloração, produção de odores desagradáveis e redução da qualidade (CHITARRA & CHITARRA, 1990), havendo a predominância de bolores e, em seguida, das bactérias ácido- lácticas, principalmente do gênero *Leuconostoc* spp., além de leveduras (VAROQUAUX & WILEY, 1994). Frutas são mais susceptíveis ao crescimento de fungos quando se tornam mais maduras ou desidratadas. Alguns fungos responsáveis pela deterioração em frutas são: *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Penicillium* sp., *Phytophthora* sp., *Geotrichum* sp. e *Rhizopus* sp. A casca das frutas, entretanto, constitui grande barreira contra as alterações microbiológicas (BRACKETT, 1994).

3.5.4. Fitopatógenos e Deterioração de Vegetais Minimamente Processados

No caso de produtos minimamente processados estes sofrem fatores como danos mecânicos, mudanças físicas e fisiológicas, que abrangem a respiração, transpiração e atividade enzimática do tecido ainda vivo após a colheita e processamento, entre outras atividades. Isso tudo predispõe os vegetais ao ataque de microrganismos patogênicos e deterioradores que podem ser fungos, bactérias ou vírus (CHITARRA & CHITARRA, 1990; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994). Assim, as reações de degradação que ocorrem afetam as qualidades organolépticas como cor, firmeza, aroma, sabor e valor nutricional, além de torná-los mais susceptíveis à perda de sua qualidade higiênico-sanitária (LOBO & GONZÁLEZ, 2006).

Como as frutas e hortaliças são cultivadas e colhidas em temperatura ambiente, nos países de clima quente como o Brasil, é comum a predominância de bactérias mesófilas. O tratamento de refrigeração que ocorre com a maioria dos alimentos minimamente processados, entretanto, pode modificar este quadro contribuindo para a predominância de psicrótrófos (VAROQUAUX & WILEY, 1994). Quando no interior da embalagem há baixa umidade, dificulta-se o crescimento bacteriano, entretanto, ao mesmo tempo se promove uma rápida desidratação do alimento, podendo facilitar uma seleção por fungos. Ao passo que a alta umidade facilita a condensação de gotículas sobre os produtos, servindo como meio difusivo de microrganismos e como caldo de cultivo (BRACKETT, 1989; BRACKETT, 1994; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994).

As bactérias *E. carotovora* e *Pseudomonas cichorii*, embora estejam comumente associadas à microflora dos vegetais *in natura*, não estão normalmente associadas aos vegetais minimamente processados quando estudada sua população. Tal fato se deve provavelmente ao processamento mínimo (BRACKETT, 1994; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994).

3.5.5. Microrganismos Patogênicos Associados aos Vegetais *in natura*

Segundo BEUCHAT (1996) e SORIANO *et al.* (2000) frutas e hortaliças podem ser contaminadas por microrganismos patogênicos durante o cultivo, colheita, pós-colheita, processamento e distribuição. Muitos agentes patogênicos são capazes de sobreviver às operações usuais de tratamento de esgotos, vindo a contaminar mananciais de água para irrigação e solo com material fecal, contaminando conseqüentemente os vegetais. Vários surtos infecciosos de febre tifóide, salmoneloses, shigeloses e hepatites envolvendo diversas hortaliças, entre elas o agrião, podem ser creditados a estes fatores (BRYAN, 1977). Apesar disto, o risco de doenças associadas a alimentos causadas pela ingestão de hortaliças ainda depende de outros fatores como: tipo de vegetal, sua produção local, modo de preparo, manipulação, manutenção sob refrigeração, virulência dos patógenos e resistência do consumidor ao agente infeccioso (LIN *et al.*, 1996). As frutas e hortaliças frescas podem ser colonizadas por diversos patógenos como as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O 157: H7 e *Campylobacter* spp., vírus além de bolores e leveduras (BARRIGA *et al.*, 1991; KING JR. *et al.*, 1991; NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; BEUCHAT, 1996; THAYER & RAJKOWSKI, 1999).

Frutas e hortaliças em geral têm sido identificadas como veículos de patógenos causadores de doenças incluindo a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, diversos sorotipos de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *S. aureus*, *Yersinia* spp., *B. cereus*, *A. hydrophila*, *C. botulinum* e *V. cholerae* (SADDIK *et al.*, 1985; BROCKLEHURST *et al.*, 1987; DAVIS *et al.*, 1988; STEINBRUEGGE *et al.*, 1988; ABDUL-RAOUF *et al.*, 1993; NGUYEN - THE & CARLIN, 1994; BEUCHAT, 1995; PONKÄ *et al.*, 1995; TAUXE *et al.*, 1997; BRACKETT, 1999; FRANCIS &

O'BEIRNE, 1999). Em 120 amostras de alface analisadas por ERCOLANI (1976) foram encontradas salmonelas em 68,3% além de contagens médias de 10^5 UFC.g⁻¹ de bactérias aeróbias mesófilas totais e 10^4 NMP/g de coliformes totais.

Surtos de infecção ocasionados por *E. coli* O157:H7 têm sido associados ao consumo de vegetais crus como alface, brotos de rabanete e de alfafa, maçãs, melões, saladas e cidras. Infecções por *E. coli* enterotoxigênicas e *L. monocytogenes* têm sido associadas ao consumo de cenouras e salada de repolho cru, tendo sido isoladas em aipo, pepino, rabanete, tomate e broto-de-feijão (ABDUL-RAOUF *et al.*, 1993; ZHAO *et al.*, 1993; DEL ROSARIO & BEUCHAT, 1995; BEUCHAT, 1996; DE ROEVER, 1998; ITOH *et al.*, 1998; BEUCHAT, 1999; BUCHANAN *et al.*, 1999). O extravasamento de fluídos do tecido de frutas e hortaliças após corte ou dano mecânico fornece nutrientes suficientes para o crescimento da *E. coli* O157: H7 mesmo na presença de elevado número de outros microrganismos que ocorrem naturalmente nas plantas (BEUCHAT, 1999). GRIFFIN & TAUXE (1991) e GUTIERREZ (1997) relatam que o patógeno tem a capacidade de crescer em fatias de pepino, alface picada, pedaços de melão e suco de maçã. Neste mesmo íterin, em 2001 nos Estados Unidos, um surto causado por *E. coli* O157:H7 foi associado ao consumo de salada de repolho cru servida em uma cadeia de *fast-food* (WU *et al.*, 2000).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é correntemente considerada um dos principais agentes que causam as denominadas infecções hospitalares. GREEN *et al.* (1974) verificaram que vegetais crus podem ser veículos primários para a introdução deste agente ao organismo dos pacientes. Outros autores encontraram em cozinhas hospitalares alimentos e saladas que continham *E. coli*, *P. aeruginosa* e espécies de *Klebsiella* e demonstraram que os pacientes poderiam adquirir tais bactérias em sua flora intestinal e ainda que, com a eliminação das verduras cruas da dieta, houve um significativo decréscimo da infecção por *Pseudomonas* em pacientes vítimas de queimaduras (SHOOTER *et al.*, 1971; KOMINOS *et al.*, 1972). GREEN *et al.* (1974) descreveram a ocorrência de *P.*

aeruginosa no solo e em plantas e a capacidade de isolados clínicos sobreviverem em vegetais durante variadas condições ambientais.

No Brasil, na década de 50, CHRISTÓVAO (1958) relatou a freqüência de bactérias indicadoras de contaminação fecal em alface, escarola, rúcula e agrião e a presença de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. em alface, todas hortaliças sendo comercializadas no Estado de São Paulo. GELLI *et al.* (1979) apontaram alta contaminação fecal em 54% das amostras de hortaliças analisadas no mesmo Estado, sendo alfaces em sua maioria. Em seus estudos sobre a contaminação da alface pela mesma espécie de bactéria, LEITÃO (1979) constatou que 75,5% das amostras apresentaram contagens de coliformes totais acima de 11.000 NMP/g e GELLI *et al.* (1979) constataram a presença de *E. coli* em 91,3% das amostras de agrião e em 88,4% das amostras de rúcula.

GELDREICH & BORDNER (1971) relatam surtos de febre tifóide e de outras salmoneloses atribuídas ao consumo de hortaliças contaminadas, especialmente alface, agrião, aipo e repolho.

O número de doenças associadas ao consumo de alimentos ocasionadas por patógenos alimentares aumentou significativamente (TAUXE *et al.*, 1997). De acordo com o CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (1989, 1994) surtos relacionados ao consumo de hortaliças no EUA foram relatados em 1988 e 1993. O primeiro teve como agente causador *Giardia* spp., acometendo 42 pessoas. O segundo teve como agente etiológico *E. coli* enterotoxigênica, acometendo 47 pessoas. Ambos tiveram como fator comum o consumo de saladas pelos envolvidos.

Em análise laboratorial de água e hortaliças de 129 produtores (Ribeirão Preto, SP) realizadas por TAKAYANAGUI *et al.* (2000) 20,1% delas apresentaram irregularidades, com concentração elevada de coliformes fecais em 17%, presença de salmonela em 3,1% e de vários enteroparasitas.

De acordo com PORTO & EIROA (2001) foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em 150 amostras de hortaliças analisadas entre alface, agrião e repolho. A *L. monocytogenes* é um patógeno que afeta o sistema nervoso central e pode causar meningite, aborto, septicemia, entre outras manifestações em humanos, além de ser considerada, juntamente com *Salmonella* sp. e *E. coli* O157:H7 uma séria ameaça à indústria de produtos frescos (ODUMERU *et al.*, 1997; BEUCHAT, 1999).

Microrganismos patogênicos entéricos como *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. podem ser veiculados por frutas e hortaliças, porém têm dificuldade de crescimento em temperaturas de refrigeração, embora nestas mesmas temperaturas, possam sobreviver por longos períodos. Por isso, durante o armazenamento de frutas e hortaliças, deve-se evitar variações de temperaturas, uma vez que temperaturas mais elevadas podem permitir o crescimento destes patógenos. A bactéria *E. coli* é um patogênico entérico que pode, tal qual a *Salmonella* sp., levar o indivíduo à morte (BRACKETT, 1994).

A. hydrophila e *L. monocytogenes* são patógenos importantes, sendo que o primeiro está presente na maioria dos vegetais. Já a *L. monocytogenes* difere de todos os outros patógenos citados por ser Gram-positiva. Sua letalidade em indivíduos susceptíveis, como crianças, idosos e gestantes pode ser de até 30%, com manifestações semelhantes a meningites e encefalites (BRACKETT, 1994; NGUYEN - THE & CARLIN, 1994).

Outro microrganismo Gram-positivo é o *Clostridium botulinum* que pode crescer em baixas temperaturas, em concentrações muito reduzidas de oxigênio e em pH moderado (> 4,6) (BRACKETT, 1994).

Parasitoses intestinais e outras enfermidades de origem parasitária também são amplamente difundidas, em especial nos países em desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2005), tendo as hortaliças papel importante neste contexto sendo carreadoras destes parasitas e completando o ciclo da rota fecal-oral de contaminação. Neste contexto, os parasitas têm na água de irrigação a ponte para

o acesso aos vegetais como descrito por AMAHMID *et al.* (1999) onde em análise de hortaliças produzidas com irrigação por água em diferentes graus de pureza, verificaram a contaminação por *Giardia* spp. apenas nos campos irrigados por água de efluentes, não se detectando contaminação nos campos irrigados por água tratada ou água de aquíferos limpos.

SILVA *et al.* (2005) em análise de diferentes tipos de hortaliças em Pernambuco verificaram a presença de *Cryptosporidium* spp. em 30% nas alfaces analisadas, *Entamoeba histolytica* em 17,5% de alfaces e em 10% de agrião e *Giardia lamblia* em 2, 5% das amostras de agrião.

GUILHERME *et al.* (1999) pesquisando 144 amostras de diferentes hortaliças, entre elas alface, agrião e rúcula, na região de Maringá-PR, verificaram que 16,6% encontravam-se contaminadas por parasitas diversos (ancilostomídeos, protozoários do grupo ameba, áscaris, etc.) onde 100% do agrião encontrava-se contaminado por um ou mais parasitas. Os autores também encontraram correlação entre a contaminação da água de irrigação utilizada e a contaminação das hortaliças. MESQUITA *et al.* (1999) por sua vez encontrou apenas parasitas com estruturas relacionadas a enfermidades em animais (protozoários ciliados e nematóides) em 6,2 % de 128 amostras de hortaliças analisadas, entre alface lisa e agrião, na região de Niterói (RJ). Os autores indicam que a variabilidade dos resultados entre os diversos trabalhos pode ser atribuída pelos diferentes graus de qualidade na higiene de plantio, irrigação, armazenagem e distribuição. De qualquer modo, para a remoção segura de parasitas destes alimentos, a recomendação por importantes agências governamentais continua sendo a lavagem criteriosa dos mesmos em água corrente de fonte segura (U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 2001a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

São várias as pesquisas a respeito das bactérias patogênicas encontradas em frutas e hortaliças, entretanto, o número de informações publicadas sobre vírus patogênicos encontrados é reduzido. Tais microrganismos não possuem a mesma

capacidade que as bactérias de crescimento em alimentos, porém, podem estar presentes em vegetais frescos e alimentos pelos mesmos fatores citados anteriormente, como a contaminação fecal durante o próprio cultivo na irrigação e fertilização, como durante a colheita do vegetal. Além de frutas e hortaliças poderem ser contaminadas pela manipulação de pessoas infectadas portadoras de viroses (SEYMOUR & APPLETON, 2001). Embora as estatísticas de doenças virais humanas transmitidas pela água e por alimentos no Brasil sejam poucas, algumas como hepatite A, poliomelite e as gastroenterites causadas por rotavírus e pelo vírus Norwalk merecem destaque (SEYMOUR & APPLETON, 2001; FRANCO & LANDFGRAF, 2004).

3.5.6. Microrganismos Patogênicos Associados aos Vegetais Minimamente Processados

L. monocytogenes, *Y. enterocolitica*, *C. botulinum* e *A. hydrophila* são patógenos de particular interesse, uma vez que possuem capacidade de crescimento em vegetais mesmo em condições brandas de preservação (NGUYEN-THE & CARLIN, 1994; FRANCIS & O'BEIRNE, 1999).

As diferentes etapas no processamento normalmente acarretam em diminuição da contaminação inicial do vegetal podendo, entretanto, acarretar em aumento no número de bactérias mesofílicas (NGUYEN-THE & CARLIN, 1994).

No caso da *Salmonella* sp. a literatura indica uma incidência variável nos minimamente processados. Segundo NGUYEN-THE & CARLIN (1994) não é comum a presença da *Salmonella* em vegetais minimamente processados. No Brasil, entretanto, em trabalho sobre hortaliças folhosas minimamente processadas adquiridas em supermercados de São Paulo, MARTINS *et al.* (2003) encontraram populações elevadas de coliformes totais, fecais entre outras *Enterobacteriaceae* além de microrganismos psicrótrófos, com contagens de 10 a 10⁷ UFC.g⁻¹. Sendo detectada *Salmonella* sp. em 3% das amostras e *L.*

monocytogenes em 0,8%, ao passo que PAULA *et al.* (2003), analisando amostras de alface minimamente processada proveniente de restaurantes em Niterói (RJ), não verificaram a presença de *Salmonella* sp.

3.6. Cloro: Vantagens e Desvantagens

Na indústria há diversos agentes utilizados como sanitizantes de alimentos dentre eles os ácidos, iodinas, componentes de amônia quaternária, compostos clorados além dos métodos de calor e irradiação (MARRIOT, 1994).

Métodos de sanitização química à base de compostos clorados, especialmente os sais de hipoclorito sob a forma de água clorada, têm sido amplamente utilizados na sanitização de água da rede de abastecimento e residuária, de alimentos como frutas, hortaliças, utensílios e equipamentos nas indústrias de processamento. Compostos à base de cloro são considerados de baixo custo e relativamente eficientes na ausência de excessiva matéria orgânica. Na forma de imersão ou aspersão, o hipoclorito tem sido o sanitizante mais amplamente utilizado no controle da contaminação microbiana de frutas e hortaliças, reduzindo o número de doenças relacionadas à alimentação, embora a redução na população de microrganismos se limite muitas vezes a até menos ou no máximo em dois ciclos logarítmicos, além de vários trabalhos terem demonstrado limitações quanto à sua habilidade na destruição de microrganismos em superfície de frutas e hortaliças (BELLAR *et al.*, 1974; TRUSSELL & UMPHRES, 1978; GREENBERG, 1980; ADAMS *et al.*, 1989; BOTT, 1991; BEUCHAT, 1992; BRACKETT, 1992b; CARLIN *et al.*, 1995; GRAHAM, 1997; BEUCHAT, 1999; KIM *et al.*, 1999; FRANCIS & O'BEIRNE, 2002).

Em certos casos os compostos clorados exercem atividade satisfatória, como na inativação de *Giardia lamblia*, onde JARROL *et al.* (1981) em seu trabalho relatam que em pH 7, à temperatura ambiente, 1,5mg.L⁻¹ de cloro livre por 10

minutos, foi capaz de inativar *in vitro* 100% das formas císticas de solução tampão fosfato contendo no mínimo 650 cistos/mL. Já a mesma efetividade não ocorre no caso de oocistos de *Cryptosporidium parvum* os quais, quando avaliados por KORICH *et al.* (1990) demonstraram ser 14 vezes mais resistentes ao cloro que os oocistos de *Giardia lamblia*, sob as mesmas condições. Em relação a outros organismos como espécies do grupo *Amoebae*, segundo trabalho de CURSONS *et al.* (1980), apresentaram sensibilidade ao cloro com reduções de até quatro ciclos logarítmicos quando expostas ao contato com 1 mg.L⁻¹ de cloro por 30 minutos.

Por outro lado, de acordo com outros pesquisadores, compostos clorados possuem desvantagens que podem limitar seu uso na indústria alimentícia pela formação de alguns subprodutos como resíduos organoclorados, trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos, que são mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos, os quais podem permanecer nos alimentos, água, água de lavagem e superfícies de contato com os alimentos afetando, assim, a saúde pública, além dos ciclos biológicos ao longo da cadeia de espécies aquáticas e terrestres no meio ambiente. Outro fator que, de acordo com estudos realizados, limita o uso de alguns compostos clorados é que os mesmos são inativados na presença de matéria orgânica (BRUNGS, 1973; BELLAR *et al.*, 1974; PAGE *et al.*, 1976; TRUSSELL & UMPHRES, 1978; KIRK & MITCHELL, 1980; GREENBERG, 1981; WEI *et al.*, 1985; KRASNER *et al.*, 1989; MINEAR & AMY, 1995; RICHARDSON *et al.*, 1998; RODGERS *et al.*, 2004).

Em países como Alemanha, Bélgica e Holanda o cloro é proibido. Na França, o cloro é tolerado, apesar de não autorizado, para a desinfecção de produtos minimamente processados. Em outros países da Europa, sua aplicação como sanitizante em vegetais minimamente processados é restrita, uma vez que resíduos clorados ou seus subprodutos devem estar ausentes no produto para o consumidor final. Nos EUA, o hipoclorito de sódio pode ser usado desde que seguido de lavagem em água da rede de abastecimento para remover o máximo possível de alguns resíduos clorados. Além disso, consumidores de produtos

orgânicos em todo o mundo rejeitam o uso de água clorada na sua sanitização (GRAHAM, 1997; XU, 1999; KHADRE *et al.*, 2001; VAROQUAUX & MAZOLLIER, 2002; KIM *et al.*, 2003; BAUR *et al.*, 2004; MACGLYNN, 2004; VAROQUAUX, 2006).

Em seus estudos BROADWATER *et al.* (1973) verificaram que o cloro em baixas dosagens não é um bactericida eficiente, embora acarrete alteração de sabor e odor nos alimentos após o tratamento sanitizante. COLLINS & DEANER (1973) relataram em suas pesquisas que resíduos clorados acima de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ podem ser tóxicos.

Trabalhos demonstram que processos de sanitização baseados em compostos clorados, em alguns casos, não apresentam eficiência satisfatória. Em 1999, BEUCHAT além de mostrar certa ineficácia do cloro como sanitizante contra alguns patógenos específicos, indica a necessidade de se desenvolver um sanitizante mais eficiente para a remoção de patógenos em frutas e hortaliças frescas. Em seu trabalho, verificou que a bactéria *E. coli* O157:H7 em alface, mesmo após tratamento com 200 mg.L^{-1} de solução clorada, além de sobreviver, não sofreu redução de sua população. FETT (2002) em seu trabalho relata que o tratamento com cloro em sementes de alfafa contaminadas não foi eficaz na eliminação de *Salmonella* sp., bem como STEWART *et al.* (2001) verificaram que o tratamento com cloro causou uma redução, mas não eliminou a *Salmonella* sp. de dois lotes de sementes de alfafa. Analisando alface e tomate minimamente processados, WEISSINGER *et al.* (2000) verificaram que é possível o crescimento de diversos sorotipos de salmonela e sua eliminação se torna difícil mesmo com tratamento utilizando concentrações de até 200 mg.L^{-1} de cloro.

Em seus estudos, BRACKETT (1987) verificou que hipoclorito a 200 mg.L^{-1} de cloro livre, em brotos de couve de Bruxelas, reduziu a população de *L. monocytogenes* em dois ciclos logarítmicos, ao mesmo tempo em que a simples lavagem em água reduziu a mesma população em um ciclo logarítmico. Em 1990 BEUCHAT e BRACKETT observaram que o tratamento com cloro em alface

picada não impediu, posteriormente, o crescimento de *L. monocytogenes* quando a mesma foi embalada sob atmosfera modificada.

Outro fator negativo em relação ao cloro é o tempo de exposição do alimento a ser sanitizado, que deve ser de no mínimo 15 minutos, conforme preconiza a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (ESTADO DE SÃO PAULO, 1999), tempo este que pode ser considerado muito longo em produções de grande escala.

Apesar de todas as desvantagens e riscos citados por pesquisadores, o cloro ainda tem sido o mais utilizado na desinfecção de produtos frescos, além do que a ausência de um sanitizante resultaria em aumento no número de doenças e mortes devido à contaminação microbiana de alimentos e água. O reconhecimento do risco potencial devido à presença de componentes carcinogênicos como os THM, que são formados da reação do cloro livre com substâncias orgânicas solúveis na água, entre outras desvantagens já citadas em relação ao cloro, propõe a aplicação de um sanitizante alternativo e seguro na indústria de alimentos (BELLAR *et al.*, 1974; RUSSELL & UMPHRES, 1978; KRASNER *et al.*, 1989; MINEAR & AMY, 1995).

3.7. Ozônio Como Alternativa

Pesquisadores têm buscado sanitizantes alternativos que sejam eficientes contra microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos, que não tragam riscos aos seres humanos e nem ao meio ambiente. Por sua característica de instabilidade e da não produção de subprodutos nocivos à saúde humana nem ao meio ambiente, o ozônio vem sendo considerado como alternativa de sanitização na indústria de alimentos em substituição ao cloro (BROADWATER *et al.*, 1973; GREENE *et al.*, 1993; KHADRE *et al.*, 2001; GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

3.7.1. Propriedades do Ozônio

Por sua propriedade única de rápida e autodecomposição, o ozônio tem sido indicado como alternativa ao cloro na sanitização de alimentos, pois logo após sua utilização se decompõe rapidamente em oxigênio molecular e água, não gerando resíduos tóxicos (GRAHAM, 1997; NEFF, 1998; KIM *et al.*, 1999; XU, 1999; KHADRE *et al.*, 2001; SOPHER *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2003).

Ozônio (O_3) é o oxigênio triatômico, sendo um gás com odor característico e pungente, cujo peso molecular é 48, o ponto de ebulição é $-111,9^{\circ}C$ e o ponto de fusão é de $-192,7^{\circ}C$ a 1 atm. É gerado naturalmente na estratosfera em pequenas concentrações ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) pela ação das radiações ultravioletas do sol sobre o oxigênio. Este elemento é criado através de carga elétrica que cliva o oxigênio molecular (O_2), resultando em dois átomos de oxigênio livre (O) que se ligam rapidamente a outras duas moléculas de oxigênio e formam o ozônio (RICE, 1981; WINDHOLZ, 1983; HORVATH *et al.*, 1985; HIGGINS, 2001; PRYOR, 2002).

Uma pequena quantidade do ozônio também é formada na troposfera como um subproduto das reações fotoquímicas entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio liberados dos automóveis, indústrias, florestas e ação vulcânica (WINDHOLZ, 1983; HORVATH *et al.*, 1985; HIGGINS, 2001).

Em relação ao cloro o ozônio tem poder oxidante 1,5 vezes maior, sendo considerado o mais forte dentre os oxidantes viáveis em alimentos; é eficiente contra um maior espectro de microrganismos; destrói *E. coli* e *Listeria* spp. entre outros patógenos mais rapidamente; é extremamente lábil, sua meia-vida na água é de apenas 20 minutos se decompondo em simples oxigênio diatômico, portanto, livre de resíduos químicos e não forma componentes persistentes e/ou prejudiciais ao meio ambiente como os THM que oferecem riscos à saúde; não se deposita no solo onde a exposição humana é grande; não é considerado carcinogênico nem mutagênico; não se acumula em tecido gorduroso nem causa efeitos crônicos ao longo do tempo; pode ser usado na reciclagem da água; reduz o nível de

pesticidas em produtos frescos, dos subprodutos do cloro e outros resíduos químicos, das demandas química (DQO) e biológica (DBO) de oxigênio, na água utilizada para lavagem e processamento dos alimentos e de micotoxinas; além de sanitizante é considerado um bom agente fumigante a ser aplicado em produtos alimentícios em estocagem para prevenir bactérias, bolores, leveduras e insetos (BRADY & HUMISTON, 1978; GREENBERG, 1981; RICE *et al.*, 1982; SHELDON & BROWN, 1986; ONG *et al.*, 1996; WOJTOWICZ, 1996; GRAHAM, 1997; MCKENZIE *et al.*, 1997; PERKINS, 1997; XU, 1999; PRYOR, 2002; SOPHER *et al.*, 2002).

Além destas, o ozônio possui mais algumas características que o tornam atraente e provavelmente mais seguro como sanitizante na indústria de alimentos. GRAHAM (1997) cita como tais características:

- Mais eficiente do que o cloro contra um vasto número de organismos;
- Tem demonstrado segurança e eficiência no tratamento de água por mais de nove décadas e para tal foi reconhecido como um produto seguro (GRAS) pelo *U. S. Food and Drug Administration* (1982) nos EUA.;
- Tem sido utilizado na Europa há décadas na indústria de alimentos;
- Numerosos estudos a respeito da utilização do ozônio para desinfecção, aumento da vida-de-prateleira e sanitização de hortaliças, frutas e outros alimentos comprovam sua eficácia como sanitizante;
- Quaisquer subprodutos que a ozonização possa produzir são similares aos produtos de uma oxidação comum, ou seja, possuem menos efeitos deletérios à saúde por não conterem os mesmos resíduos produzidos por compostos clorados.

3.7.2. Produção Comercial do Ozônio

Comercialmente o gás ozônio é gerado do próprio ar ou do oxigênio puro através de uma descarga elétrica ou por luz ultravioleta. Devido à sua instabilidade e rápida decomposição deve ser gerado no local e utilizado imediatamente (HORVATH *et al.*, 1985; LIANGJI, 1999; IBANOGLU, 2002), não podendo ser estocado. Tal fato o torna controlável pois em casos de acidentes não irá persistir no meio ambiente por longo período de tempo em comparação a um gás tóxico estável (PRYOR, 2002; KIM *et al.*, 2003). O equipamento de ozonização utilizado na produção industrial é relativamente simples incluindo gerador, tanque de contato, sistema de gás, destruidor de ozônio, filtro, monitor de ozônio e sistema de exaustão (XU, 1999).

3.7.3. Mecanismos de Ação

O ozônio possui um alto potencial de oxidação associado à habilidade de se difundir através de membranas biológicas, sendo a superfície da célula microbiana o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente do ataque através da oxidação dos glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos da parede microbiana, alterando a permeabilidade celular e causando sua rápida lise. Ataca também grupos sulfidril de enzimas ocasionando o colapso da atividade enzimática celular, além de sua ação sobre o material nuclear dos microrganismos, alterando as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucléicos, como ocorre com alguns vírus onde o ozônio destrói seu RNA além de alterar as cadeias polipeptídicas de sua cápside protéica (VICTORIN, 1992; KIM *et al.*, 1999).

O ozônio inativa numerosas bactérias, incluindo Gram-negativas e Gram-positivas, células vegetativas e esporos, além de componentes do envelope celular, esporos ou cápsides virais a concentrações relativamente baixas e em

reduzido tempo de contato (BROADWATER *et al.*, 1973; KIM *et al.*, 1999; KHADRE *et al.*, 2001).

3.7.4. Efeitos da Utilização do Ozônio

O ozônio é descrito como um dos mais potentes sanitizantes conhecidos que se auto-decompõe rapidamente a um produto atóxico (O_2), não deixando resíduos nos alimentos e não tendo sido descritos efeitos deletérios em seres humanos sob condições normais de uso (LIANGJI, 1999; KHADRE *et al.*, 2001; SOPHER *et al.*, 2002). Diariamente o homem é exposto a pequenas concentrações de ozônio, uma vez que o mesmo é encontrado na atmosfera como resultado da oxidação fotoquímica dos hidrocarbonetos emitidos pelos automóveis e pelas indústrias, além de ser produzido também por transformadores elétricos, fotocopiadoras, entre outros aparelhos elétricos (XU, 1999; PRYOR, 2002).

Concentrações muito altas do gás podem causar oxidação na superfície de alimentos resultando na descoloração dos mesmos e alteração do sabor (KIM *et al.*, 1999).

Em situações extremas, a exposição excessiva ao ozônio em altas concentrações por várias horas pode acarretar em: lacrimejamento, dificuldade de respiração, respiração superficial, congestão pulmonar, irritação das vias respiratórias superiores, cefaléia e pré-síncope. O órgão estadunidense que trata da saúde e segurança ocupacional (OSHA) estabelece os limites de exposição curta e longa ao ozônio (TLV-STEL e TLV-LTEL) no ambiente de trabalho que variam de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ar para uma jornada de trabalho de 8 horas diárias/ 40 horas semanais e de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de ar por 15 minutos, para uma utilização segura do gás (STOCKINGER, 1965; XU, 1999; KIM *et al.*, 2003). Dentro dos limites internacionalmente estabelecidos e utilizando-se equipamentos adequadamente projetados e operados, o ozônio pode ser utilizado seguramente.

3.7.5. Origem, Primeira Utilização e Reconhecimento do Ozônio como Agente Seguro (GRAS)

O ozônio foi identificado primeiramente por Schonbein em 1839. Sabe-se, há muito tempo, que o ozônio é um sanitizante eficiente no tratamento de produtos alimentícios e é utilizado em vários países da Europa e Ásia. O início do uso do ozônio como agente sanitizante na indústria alimentícia é registrado na literatura desde o início do século 20 como sendo utilizado na preservação de alimentos e ingredientes no continente europeu (KIM *et al.*, 1999). HILL & RICE (1982) também relatam que o ozônio, desde o início do século 20, já era conhecido como agente coadjuvante de processamento de alimentos e bebidas, sendo bastante utilizado na purificação e envelhecimento artificial de bebidas alcoólicas, incluindo vinhos e destilados e na manufatura de cidra, como agente de desinfecção e controlador de odor. Na Europa tem sido comumente utilizado segura e eficientemente no tratamento de águas de abastecimento de rede pública e no processamento de alimentos há muitas décadas (RICE *et al.*, 1982; GRAHAM, 1997). Comercialmente, foi utilizado pela primeira vez em 1907 em Nice (França), no tratamento de água potável do município e em 1910, em Saint Petesburg (KOGELSCHATZ, 1988 *apud* GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

Nos EUA foi utilizado primariamente com a função de remover íons ferro, manganês, cor, sabores ou odores em produtos alimentícios e água (O'DONOVAN, 1965); desde 1933 numerosos experimentos têm sido realizados em ampla variedade de frutas e hortaliças, incluindo maçãs, batatas, tomates, morangos, brócolis, pêras, laranjas, pêssegos, uvas, milho e soja e, em 1940, foi instalada a primeira planta de tratamento de água potável através da ozonização contínua. Em 1982 o FDA (United States Food and Drugs Administration) declarou a ozonização de água engarrafada como segura, integrando a lista de produtos "Generally Recognized as Safe" (GRAS) (U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 1982). Em 1987 mais de duzentas plantas de tratamento de água potável utilizavam ozônio (GRAHAM, 1997; PERKINS, 1997).

Em 1997 o ozônio foi reconhecido “Generally Recognized as Safe” (GRAS) como sanitizante de alimentos por um painel independente numa reunião de especialistas no assunto (GRAHAM, 1997; SOPHER, 2002) e em 2001, foi declarado seguro como aditivo secundário para uso direto em alimentos (U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 2001).

Atualmente o ozônio é utilizado em países da Europa sendo empregado também como agente sanitizante em indústrias de alimentos nos Estados Unidos sem nenhuma restrição (GRAHAM, 1997). Estudos prévios indicam que o ozônio pode ser utilizado como antimicrobiano seguro e eficiente em inúmeras aplicações, onde baixas concentrações e reduzido tempo de contato são suficientes para o controle ou redução da população microbiana (KIM *et al.*, 1999).

3.7.6. Aplicações do Ozônio

KIM *et al.* (1999) determinaram a eficácia do ozônio contra microrganismos associados aos alimentos como *P. fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 e verificou que todos os microrganismos foram inativados em 1,5 a 5 ciclos logarítmicos à concentração de ozônio entre 1 e 1,5 mg.L⁻¹ em 15 segundos de exposição ao gás, sendo a *L. monocytogenes* o microrganismo que apresentou maior redução de sua população.

Outras vantagens decorrentes do tratamento com ozonização são a inibição do desenvolvimento fúngico, a manutenção da cor por doze dias da superfície de amoras, além da remoção do etileno, liberado por muitas frutas durante o amadurecimento, acarretando no aumento da sua vida-de-prateleira (RICE *et al.*, 1982; BARTH *et al.*, 1995).

Quanto ao crescimento fúngico, EWELL (1938) afirma que dependendo do estado da limpeza das hortaliças submetidas à desinfecção por ozônio, sua aplicação contínua a concentrações de 0,6 a 1,5 mg.L⁻¹ por alguns minutos é suficiente para prevenir crescimento de bolores que podem alterar esses

alimentos. Segundo FAROOQ & AKHLAQUE (1983) o ozônio também tem o poder de inativar leveduras em alimentos. Populações de *Candida parapsiolis* obtiveram redução de dois ciclos logarítmicos após exposição por 1,67 minutos de concentrações de 0,23-0,26 mg.L⁻¹ de ozônio. Já KAWAMURA *et al.* (1986) obtiveram em seus trabalhos redução de dois ciclos logarítmicos para populações de *Candida tropicalis* após exposição à concentração de 0,02 mg.L⁻¹ de ozônio por 20 segundos ou a 1 mg.L⁻¹ por 5 segundos. SARIG *et al.* (1996) verificaram que ozônio gasoso na concentração de 8 mg.min⁻¹ sobre três variedades de uvas de mesa praticamente eliminou as populações de bactérias, bolores e leveduras no intervalo de 10 a 60 minutos; ao passo que OGAWA *et al.* (1990) verificaram que ozônio aquoso, na concentração de 3,8 mg.L⁻¹ por 10 minutos, inativou esporos de *Botrytis cinerea* em superfície não danificada de tomate.

ZHAO & CRANSTON (1995) também observaram que grãos inteiros de pimenta preta contaminados por *Salmonella* spp., *S. aureus*, *B. cereus* e os fungos *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., ao serem imersos em água ozonizada (6,7mg.L⁻¹) por 10 minutos tiveram as contagens desses microrganismos reduzidas em três a quatro ciclos logarítmicos.

RESTAINO *et al.* (1995) verificaram que água ozonizada reduziu em mais de quatro ciclos logarítmicos populações *in vitro* de bactérias como *Salmonella* sp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *Y. enterocolitica*, além das leveduras *Candida albicans* e *Zygosaccharomyces bailii*.

WALDROUP *et al.* (1993) verificaram que a utilização do ozônio na água de resfriamento de carcaça de aves resultou na ausência de qualquer célula de *E. coli* viável ou de coliformes presuntivos e na contagem reduzida de aeróbios totais. SHELDON & BROWN (1986) aplicaram o ozônio diretamente em carcaças de aves e verificaram que o mesmo destruiu mais do que duas unidades logarítmicas dos microrganismos encontrados sem haver oxidação lipídica significativa,

desenvolvimento de odores desagradáveis (*off-flavours*) ou a perda de cor na carcaça.

O tratamento de maçãs com ozônio resultou em menor deterioração e perda de peso e conseqüente aumento na vida-de-prateleira, o que tem sido atribuído à oxidação do etileno (BEUCHAT, 1992).

DOSTI *et al.* (2005) compararam a eficiência do ozônio em relação ao cloro contra *P. fluorescens*, *P. fragi* e *P. putida*, bactérias capazes de formar biofilme sobre a superfície dos equipamentos. Foram utilizadas concentrações de cloro e ozônio, respectivamente, de 100 mg.L⁻¹ por 2 minutos e 0,6 mg.L⁻¹ por 10 minutos. O ozônio exerceu maior ação na redução da contaminação por *P. putida* que o cloro, sendo que para os demais microrganismos os resultados foram similares.

GUZEL-SEYDIM *et al.* (2000) estudaram, nas indústrias de laticínio, a utilização de água ozonizada no pré-enxágüe de equipamentos, usualmente realizado com água a 40°C. O tratamento-teste removeu 84% dos resíduos lácteos, enquanto que a água aquecida removeu apenas 51%.

Águas residuárias de plantas de processamento de laticínios, produtos marinhos e abatedouros geralmente contêm grandes quantidades de carboidratos, gorduras, proteínas e sais minerais e a degradação completa desses efluentes é complexa, acarretando em poluição das águas, uma vez que essa grande quantidade de material orgânico serve como fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos, que por sua vez, podem proliferar rapidamente causando a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água. Sanitizantes químicos são rotineiramente introduzidos nesses sistemas e no meio ambiente com efeitos deletérios nos delicados ecossistemas complicando ainda mais a sua degradação, sendo tóxicos ao meio ambiente. Resíduos de uma indústria de laticínios foram tratados com ozônio. Sua demanda bioquímica de oxigênio foi reduzida em 15%. O ozônio pré-oxida o material orgânico, tornando-o mais fácil para a biodegradação (GUZEL-SEYDIM, 1996 *apud* GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

KHADRE *et al.* (2001) verificaram, em laboratório, redução de dois ciclos logarítmicos na contagem total de microrganismos e uma redução significativa de espécies deteriorantes comumente encontradas nas frutas e hortaliças.

Hortaliças como brócolis e pepino sem sementes tiveram sua vida-de-prateleira aumentada por ozonização na concentração de 0,04 mg.L⁻¹ (SKOG & CHU, 2001).

Estudo realizado por KIM *et al.* (1999) mostrou que alface picada tratada com ozônio na concentração de 1,3Mm por 3 minutos, resultou em decréscimo na contagem de bactérias mesofílicas e psicrotróficas em 1,4 e 1,8 ciclos logarítmicos, respectivamente; por 5 minutos, houve redução, respectivamente, dos mesmos microrganismos em 3,9 e 4,6 ciclos logarítmicos.

Em seus estudos com aipo minimamente processado, ZHANG *et al.* (2005) verificaram que o tratamento com água ozonizada na concentração de 0,18 mg.L⁻¹ foi efetivo na redução da população de microrganismos além de ter retardado mudanças fisiológicas degradativas, proporcionando melhor preservação do vegetal.

Outras pesquisas como as de KORICH *et al.* (1990) indicam que o ozônio dissolvido em água na concentração de 1,1 mg.L⁻¹ por 5 minutos reduziu *in vitro* a contagem de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em oito ciclos logarítmicos. Sob as mesmas condições o dióxido de cloro precisou de 90 minutos em concentração de 80 mg.L⁻¹ para obter o mesmo desempenho de inativação do primeiro tratamento. PEETERS *et al.* (1989) verificaram que soluções aquosas com concentrações de 2,2 mg.L⁻¹ de ozônio por 8 minutos inativaram 10⁵ oocistos do mesmo agente. WICKRAMANAYAKE *et al.* (1984) relatam uma redução de quatro ciclos logarítmicos *in vitro* nas contagens de *Giardia lamblia*, quando em contato com água ozonizada a 0,15 mg.L⁻¹ por tempo aproximado de 2 minutos.

3.8. Análise Sensorial de Alimentos

A aceitação de um produto pelo consumidor se baseia em atributos sensoriais como frescura, aroma e aparência. Em segundo lugar vem o valor nutricional e o preço (BALLESTEROS, 1995). Deste modo a implantação de um novo processo tecnológico na indústria de alimentos deve estar vinculada à aceitação do produto oriundo deste processamento pelo público consumidor. A análise sensorial fornece dados que possibilitam a avaliação de vários aspectos organolépticos do produto facilitando a predição da aceitabilidade do consumidor.

Segundo o Institute of Food Science and Technology (IFT) a análise sensorial é uma disciplina científica utilizada para medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidos pelos órgãos da visão, olfação, gustação, tato e audição. Representa campo importante na Indústria de Alimentos pois contribui para a determinação da qualidade de um produto novo e estuda a determinação dos sabores agradáveis dos alimentos e bebidas através dos órgãos dos sentidos (MONTEIRO, 1984).

Os métodos sensoriais, também chamados subjetivos são baseados nas respostas aos estímulos sensoriais. O estímulo produz uma sensação cujas dimensões podem ser expressas em: intensidade, extensão, duração, qualidade e gosto ou desgosto (MORAES, 1993).

Para a aplicação dos métodos subjetivos empregam-se equipes de degustadores selecionados que se baseiam em suas próprias impressões sensoriais para o julgamento de um alimento. Desta forma pode-se dizer que o ser humano é o aparelho que registra as medidas (MORAES, 1993).

Este procedimento pode ser realizado por pequenas equipes como a de um laboratório (6 a 20 pessoas) ou por uma equipe massal (julgamento de várias centenas de pessoas) e desta forma medir a aceitação do consumidor para esse determinado produto (MORAES, 1993).

Cabe à análise sensorial transformar a sensação experimentada por humanos em resposta ao estímulo provocado pelo alimento em dados qualitativos

e quantitativos. Estes dados devem ser adequados à análise estatística permitindo a interpretação dos resultados. O método largamente aceito para que as sensações possam ser mensuradas é através da utilização de fichas de avaliação. Estas fichas podem possuir diferentes tipos de escalas que, no geral, avaliam a intensidade do atributo julgado ou o quanto as amostras estudadas diferem entre si ou se são aceitáveis ou não. De posse dos dados de julgamento pode-se avaliar a probabilidade dos grupos de amostras analisadas possuírem diferenças significativas entre si através do uso de ferramentas estatísticas como a análise de variância (teste F) e a diferença entre as médias (teste de Tukey) (MORAES, 1993).

Nas últimas décadas uma ampla variedade de metodologias sensoriais vêm sendo desenvolvidas de modo que algumas ganharam e mantêm popularidade até os dias de hoje. Segundo MEILGAARD *et al.* (1999) cada trabalho deve desenvolver sua própria metodologia descritiva adaptada ao produto e projeto de aplicação, devendo-se considerar as diferentes técnicas e suas combinações antes de se decidir qual deverá ser utilizada.

Na literatura é encontrada uma grande variedade de classificações das metodologias de análise sensorial, que variam de acordo com cada autor. Tomando por base a sistemática de classificação proposta por ANZALDÚA-MORALES (1994), os métodos sensoriais podem ser divididos em: provas afetivas, provas de diferença e provas descritivas. As provas afetivas ou de preferência e aceitação são aquelas nas quais o julgador expressa sua reação subjetiva frente à amostra indicando sua aceitação ou rejeição. Tal prova tem por objetivo avaliar o desejo ou não da aquisição do produto. As provas de diferença ou discriminativas são aquelas em que não se necessita conhecer a sensação subjetiva que o alimento produz à pessoa, apenas visam estabelecer se existe diferença entre duas ou mais amostras e em alguns casos a magnitude ou importância desta diferença. Os métodos descritivos relatam sensorialmente o produto. Isto significa definir os atributos importantes de um alimento (sabor, odor, textura, entre outros) e medir a intensidade de tais atributos. Neste caso, não são

importantes as preferências ou aversões dos provadores, também não há importância no momento da prova se as diferenças entre as amostras são perceptíveis ou não. Vários métodos descritivos vêm sendo desenvolvidos e publicados com variações quanto à filosofia e metodologia. Dentre estes, podemos citar como exemplos o perfil de sabor, o perfil de textura, a qualificação proporcional, o método tempo-intensidade, a análise descritiva quantitativa (ADQ) e as análises descritivas genéricas (ANZALDÚA-MORALES, 1994; MEILGAARD *et al*, 1999; PEREIRA & AMARAL, 1997 *apud* MELLO *et al.*, 2003).

Na análise descritiva, com o uso de métodos de escala, as amostras codificadas são apresentadas aos provadores que, por sua vez, registram suas reações numa escala que pode ser estruturada ou não estruturada. Na primeira, todos os graus e termos aparecem e na segunda, há uma linha que não possui pontos marcados, aparecendo somente nas extremidades os termos que expressam o máximo e o mínimo de intensidade dos parâmetros testados. Esta linha pode ser vertical ou horizontal e o provador deverá fazer um traço horizontal ou vertical no ponto em que ele pensa representar a intensidade relativa à característica da amostra em teste, sendo esses dados, posteriormente, transformados em números e analisados estatisticamente pela análise de variância (MORAES, 1993).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento da Pesquisa

A pesquisa foi realizada em dois períodos. Cada período consistiu na recepção das hortaliças, processamento mínimo com os diferentes tratamentos sanitizantes, embalagem, manutenção dos produtos sob refrigeração e análises microbiológicas com amostras em duplicata. A análise sensorial foi realizada no segundo período.

4.2. Amostras

Foram processadas cerca de trezentas e sessenta amostras adquiridas *in natura* de produtores da região de Campinas (SP), sendo noventa amostras em média para cada tipo de hortaliça: agrião, alfaces tipo americana e crespa e rúcula. Tais espécies foram selecionadas por serem as hortaliças minimamente processadas mais comumente encontradas no varejo.

As amostras foram transportadas e processadas em temperatura ambiente simulando as condições encontradas em grande parte das empresas de processamento de hortaliças. O processamento mínimo foi realizado dentro de 24 horas após a colheita.

4.3. Ozonizador

Foi utilizado como fonte de ozônio equipamento fornecido pela White Martins Praxair Gases Industriais S/A. O ozonizador, montado em escala piloto, consiste em um tubo dielétrico (gerador de ozônio) por onde o oxigênio advindo de cilindro de 45 litros é submetido à descarga elétrica que transforma o O_2 em molécula de ozônio O_3 pela adição de um átomo. A seguir, o ozônio formado é levado até a câmara de mistura (reator) onde o mesmo é dosado e injetado em

meio à água. O turbilhonamento resultante faz com que o gás seja integrado ao líquido tornando a água ozonizada. Esta água foi utilizada imediatamente após sua produção.

O processo de produção de água ozonizada está representado no diagrama a seguir.

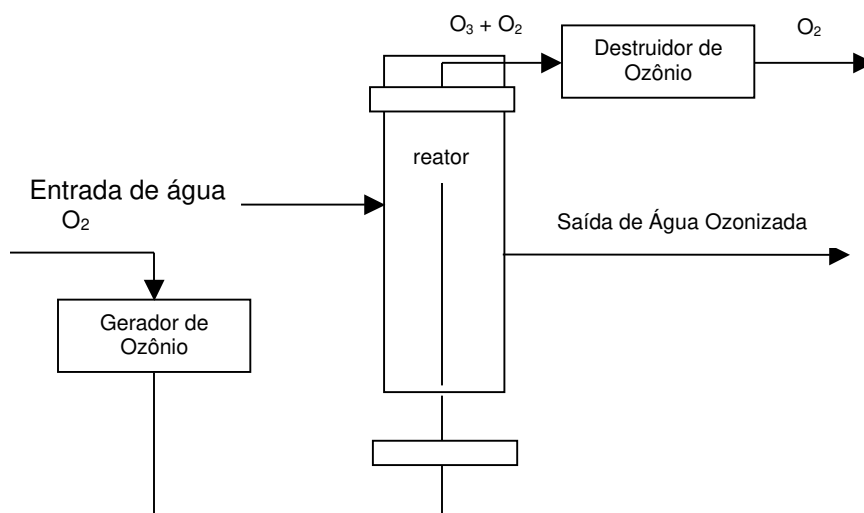


Figura 1. Diagrama de equipamento para produção de água ozonizada.

4.4. Etapas do Processamento Mínimo

As etapas do processamento mínimo realizadas neste trabalho seguiram os procedimentos usuais nas indústrias de processamento de hortaliças.

- **Corte do Talo e Desfolhamento**

O corte do talo e desfolhamento das hortaliças foi realizado com auxílio de facas inoxidáveis de lâmina fina.

- **Primeiro Toalete**

No primeiro toalete foram descartadas as folhas externas e as internas que apresentaram qualquer tipo de danos.

- **Primeira Lavagem**

A primeira lavagem foi realizada através da imersão das folhas em tanque de aço inoxidável contendo água da rede de abastecimento e agitadas manualmente.

- **Segundo Toalete**

No segundo toalete foram retiradas folhas com danos não detectados anteriormente.

- **Corte em Tiras**

O corte em tiras foi efetuado manualmente com o auxílio de facas inoxidáveis de lâmina fina. Tal etapa foi realizada apenas na alface americana, normalmente comercializada nesta forma.

- **Segunda Lavagem**

A segunda lavagem foi realizada em bandejas de aço inoxidável contendo água da rede de abastecimento e agitadas manualmente, com a finalidade de remoção do suco celular presente nas extremidades cortadas das tiras de folhas.

- **Tratamentos de Imersão**

- **Amostra Controle**

- A amostra controle foi submetida apenas às operações de lavagem com água da rede de abastecimento.

- **Amostra Padrão**

- A amostra padrão foi submetida a tratamento de imersão em água clorada com 100 mg.L^{-1} de cloro livre durante 15 minutos. A concentração de cloro livre na água foi medida através do método iodométrico (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998).

- **Amostra Submetida ao Ozônio**

- O tratamento de imersão em água ozonizada foi realizado em um tanque de aço inoxidável acoplado ao equipamento de ozonização da água. Foram realizados ensaios com três diferentes concentrações de ozônio: $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Durante a imersão foram coletadas amostras da água ozonizada para o monitoramento da concentração do gás através de kit colorimétrico baseado no método de índigo (BADER & HOIGNÉ, 1981). Mantiveram-se constantes o tempo de imersão (1 min.) e a proporção água ozonizada/hortaliça (12:2 L/kg), sendo utilizada água destilada.

- **Centrifugação**

Após ozonização as folhas das hortaliças foram centrifugadas a 170g por 2 min para a retirada da água da superfície.

- **Acondicionamento**

O acondicionamento foi realizado em sacos de polietileno de baixa densidade contendo 120 g de produto.

- **Manutenção sob Refrigeração**

A manutenção dos produtos para os ensaios foi efetuada em câmara fria à temperatura de $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de oito dias.

As etapas de processamento das verduras bem como os diferentes tratamentos de sanitização estão descritos no fluxograma a seguir.

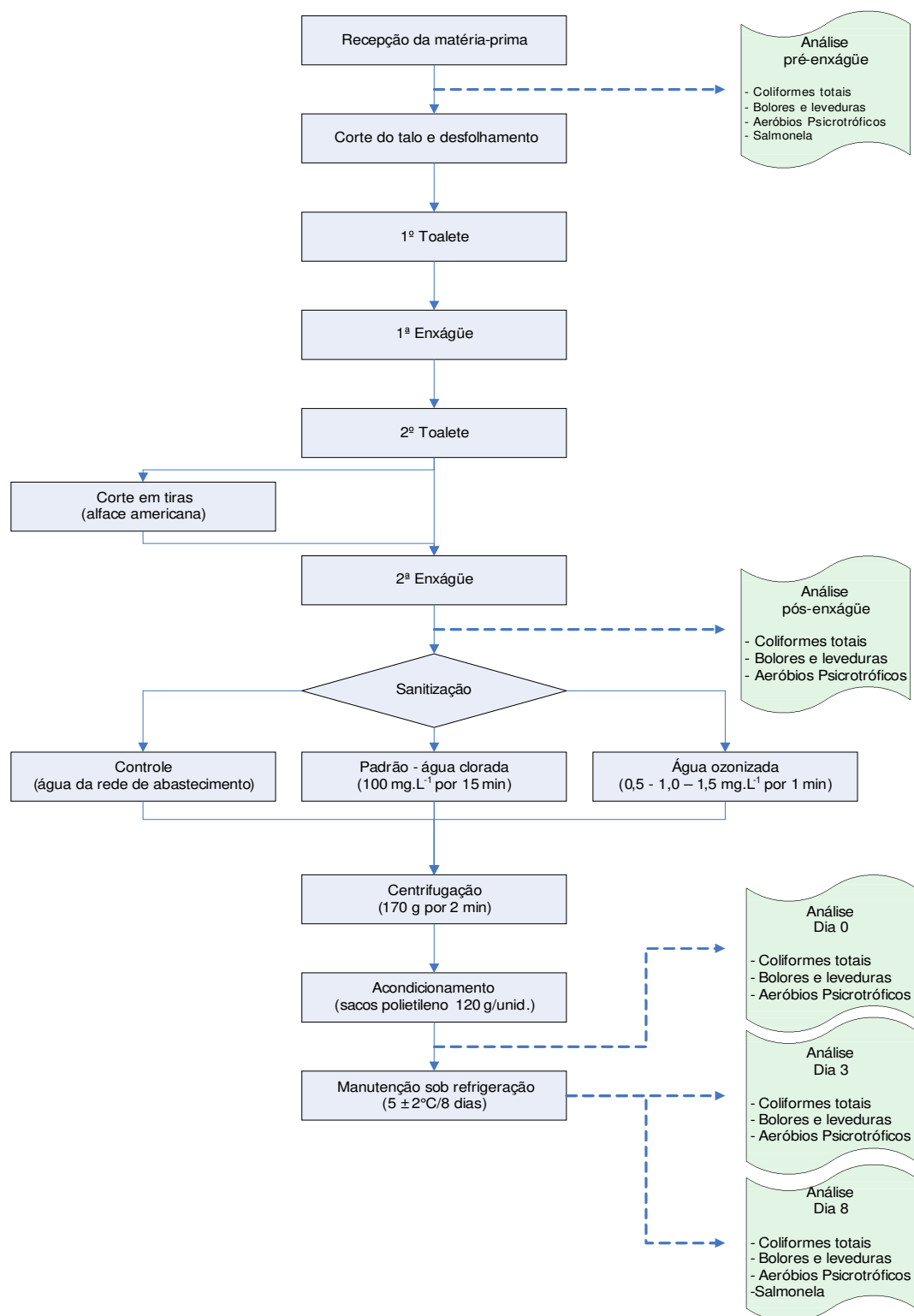


Figura 2. Fluxograma geral das etapas de processamento das hortaliças folhosas minimamente processadas.

4.5. Análises Microbiológicas

Para as análises microbiológicas foi considerado como unidade amostral o conteúdo do pacote de 120 g de produto minimamente processado.

As amostras foram submetidas às seguintes análises microbiológicas:

- Contagem total de microrganismos aeróbios psicrotróficos;
- Contagem de coliformes totais;
- Contagem de bolores e leveduras;
- Pesquisa para *Salmonella* spp.

Estas análises foram realizadas em quatro momentos distintos:

- Imediatamente antes do processamento mínimo (pré-enxágüe);
- Imediatamente após os enxágües e antes dos tratamentos de imersão (pós-enxágüe);
- Imediatamente após os tratamentos de imersão (dia 0);
- Nos dias 3 e 8 após o processamento mínimo com a manutenção dos produtos sob refrigeração (exceto a pesquisa para *Salmonella* spp., realizada imediatamente antes do processamento mínimo e no dia 8).

Cada análise microbiológica foi realizada utilizando-se amostras em duplicata.

Para fins de avaliação da redução microbiana determinada pelos diferentes tratamentos sanitizantes, foi considerada como população inicial a contagem de microrganismos das amostras imediatamente antes dos tratamentos sanitizantes (pós-enxágüe) e como população final a contagem de microrganismos das amostras imediatamente após cada tratamento. O valor da redução da população microbiana oriunda dos diferentes tratamentos foi obtido através da diferença entre os valores da contagem das populações finais e iniciais.

Todas as análises seguiram metodologias citadas pela *AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION* (2001).

4.5.1. Preparação das Amostras para Análise Microbiológica

Pesaram-se 25 g das amostras que foram adicionadas a 225 ml de água peptonada 0,1% e homogeneizadas em “Stomacher” 400 Laboratory Blender (Seward Inc.). Em seguida distribuídas em diluições decimais, estando prontas para a inoculação nos meios específicos para as diferentes análises.

4.5.2. Contagem Total de Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos

Utilizou-se o método de filme seco reidratável (*Petrifilm Aerobic Count Plate* – 3M). As placas foram inoculadas com 1 mL das amostras já preparadas sendo incubadas a 7°C/10 dias. As colônias características foram enumeradas.

4.5.3. Contagem de Coliformes Totais

Utilizou-se o método de filme seco reidratável (*Petrifilm Coliform Count Plate* – 3M). As placas foram inoculadas com 1 mL das amostras já preparadas e incubadas a 35°C/24h. As colônias características foram enumeradas.

4.5.4. Contagem de Bolores e Leveduras

Utilizou-se o método de filme seco reidratável (*Petrifilm Yeast and Mold Count Plate* – 3M). As placas foram inoculadas com 1 mL das amostras já preparadas e incubadas a 25°C/3-5 dias. As colônias características foram enumeradas.

4.5.5. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foi utilizada a metodologia para detecção através das etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento diferencial e confirmação preliminar (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2001). A análise desse patógeno foi realizada nas amostras iniciais antes do processamento mínimo e no final do período de manutenção sob refrigeração.

- **Pré-enriquecimento**

25 g das amostras são adicionadas em 225 mL de Caldo Lactosado. A mistura homogeneizada em aparelho “Stomacher”, sendo incubadas a 35°C/24h.

- **Enriquecimento Seletivo**

Após a incubação, retira-se alíquotas de 1 mL do caldo lactosado e adicionadas em dois meios seletivos distintos: Meio Tetrationato e Meio Selenito Cistina. Estes são incubados, respectivamente, a 43°C/24h e a 35°C/24h.

- **Plaqueamento Seletivo Diferencial**

O inóculo dos dois meios de enriquecimento seletivo são estriados em três meios seletivos diferenciais distintos: Ágar Bismuto Sulfito, Ágar Xilose Lisina Desoxicolato e Ágar Entérico de Hektöen. Os meios são incubados a 35°C/24h.

- **Confirmação Preliminar para *Salmonella* spp.**

As colônias típicas suspeitas identificadas nos meios seletivos diferenciais são inoculadas em tubos inclinados de Ágar Tríplice Açúcar Ferro e Ágar Lisina Ferro. Estas serão incubadas a 35°C/24h. Após a incubação é realizada a leitura dos tubos e identificadas as colônias que produziram reação característica para *Salmonella* spp.

- **Confirmação Definitiva de *Salmonella* spp.**

As colônias características nas provas anteriores são confirmadas definitivamente através dos testes bioquímicos de urease, dulcitol, malonato e indol.

- Prova de urease: São transferidos inóculos dos tubos de Ágar Tríplice Açúcar Ferro para tubos com Caldo Uréia de Christensen, sendo em seguida incubados a 35°C/24h. Após a incubação, é realizada a leitura e identificação.
- Prova de dulcitol: São transferidos inóculos dos tubos de Ágar Tríplice Açúcar Ferro para tubos com Caldo Vermelho de Fenol suplementado com 0,5% de dulcitol, sendo em seguida, incubados a 35°C/24-48h. Após a incubação, é realizada a leitura e identificação.
- Prova de malonato: As colônias suspeitas oriundas dos tubos de Ágar Tríplice Açúcar Ferro são inoculadas em Caldo Triptona e incubadas a 35°C/24h. A seguir, transferidas para Caldo Malonato e incubadas a 35°C/24-48h. Após a incubação, realiza-se a leitura e identificação.
- Prova de indol: As colônias suspeitas oriundas dos tubos de Ágar Tríplice Açúcar Ferro são inoculadas em Caldo Triptona e incubadas a 35°C/24h. A seguir, 5 mL serão transferidos para tubos estéreis, sendo acrescentados 0,2-0,3 mL de Reativo de Kovacs. Logo em seguida, realiza-se a leitura e identificação. Os tubos com resultado negativo devem ser reincubados e novamente submetidos à prova com 48 h de incubação.

4.6. Análise Sensorial

As amostras foram avaliadas subjetivamente quanto aos atributos: cor verde, cor amarela, aroma e textura, conforme terminologia descritiva mostrada na *Tabela 2*.

Tabela 2. Terminologia descritiva para avaliação sensorial de hortaliças folhosas minimamente processadas.

Atributo		Amostra	Descrição	
			notas menores	notas maiores
Aparência	Cor verde	Alface americana	verde-claro: cor verde clara e talo esbranquiçado. Em folhas mais tenras pode chegar a verde-translúcido.	verde escuro: tonalidade mais escura de verde em relação ao da amostra fresca.
		Alface crespa	verde-claro: cor verde clara e talo esbranquiçado.	verde escuro: tonalidade próxima ao verde-folha ou mais escura. Talo esbranquiçado.
		Agrião		
		Rúcula		
	Cor amarela	Alface americana	não amarelado: coloração verde característica de amostras frescas ou recém-colhidas.	muito amarelado: áreas definidas ou difusas com coloração amarelo-esverdeada, translúcidas ou não.
		Alface crespa		
		Agrião		
		Rúcula		
Aroma		Alface americana	pouco característico: aroma de vegetais oxidados, em processo de autólise ou demais aromas não característicos de amostras frescas.	característico: aroma característico do produto fresco.
		Alface crespa		
		Agrião		
		Rúcula		
Textura (não oral)		Alface americana	murcha: amostra amolecida, curvando-se com facilidade e apresentando dificuldade de quebra quando amassada entre os dedos, podendo haver áreas autolisadas.	crocante: amostra firme, com facilidade de cisalhar-se quando curvada ou tracionada. Fragmenta-se quando amassada entre os dedos. Crocância também apresentada na nervura central da folha.
		Alface crespa	murcha: amostra murcha com superfície amolecida e enrugada, podendo haver áreas autolisadas.	crocante: amostra não-murcha, com superfície firme e lisa. Crocância apresentada na nervura central da folha
		Agrião		
		Rúcula		

Participaram dos testes uma equipe de quinze provadores orientados acerca da terminologia descritiva para avaliação, onde foram analisadas amostras refrigeradas dos dias 0, 3 e 8. Foram apresentadas aos provadores, em pratos

plásticos brancos, aproximadamente 30 gramas de amostra. A equipe realizou o julgamento subjetivo dos atributos sensoriais, registrando-os em fichas de avaliação com escalas de intervalo não estruturadas de 9 cm de comprimento, conforme *Figura 3*. A avaliação de intensidade realizada pelo provador foi posteriormente convertida em notas numéricas pelo uso de escala ou régua.

Para esta análise foi utilizado delineamento estatístico inteiramente casualizado, sendo os valores obtidos submetidos à análise estatística de variância (Teste F) e diferença entre as médias (Teste de Tukey) com nível de significância de 5%, conforme procedimentos descritos por MORAES (1993).

ANÁLISE SENSORIAL DE AGRIÃO MINIMAMENTE PROCESSADO	
Nome: _____	Data: _____
Por favor, avalie as amostras e marque com um traço vertical nas escalas abaixo, a posição que identifique melhor a intensidade da característica avaliada.	
APARÊNCIA	
Cor verde	
_____ verde claro	_____ verde escuro
Cor amarela	
_____ não amarelado	_____ muito amarelado
AROMA	
_____ pouco característico	_____ característico
TEXTURA (não oral)	
_____ murcha	_____ crocante

Figura 3: Modelo de ficha de avaliação sensorial.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito do Enxágüe em Água Corrente Sobre a Contaminação dos Diferentes Microrganismos Presentes nas Hortaliças

Antes do processamento mínimo todas as hortaliças apresentaram contagens de coliformes totais e de bolores e leveduras maiores do que 10^3 UFC.g⁻¹. Dentre os microrganismos estudados, o grupo predominante em todas as hortaliças antes da lavagem foi o grupo dos coliformes totais com contagem média de 6,35 log₁₀ UFC.g⁻¹. Em seguida, o grupo dos bolores e leveduras, com contagem média de 4,98 log₁₀ UFC.g⁻¹. Os microrganismos aeróbios psicrotróficos são os que apresentaram menor contagem média entre as amostras analisadas desde antes do processamento (3,00 log₁₀ UFC.g⁻¹) até o final do estudo.

A contaminação microbiana das hortaliças pesquisadas imediatamente antes do processamento mínimo está descrita na *Tabela 3*.

Tabela 3. Contagem microbiana média inicial das amostras de hortaliças folhosas analisadas antes do enxágüe em água da rede de abastecimento (pré-enxágüe).

Produto	Coliformes Totais (log₁₀ UFC.g⁻¹)	Bolores e Leveduras (log₁₀ UFC.g⁻¹)	Aeróbios Psicrotróficos (log₁₀ UFC.g⁻¹)
Agrião	6,8	5,62	3,7
Alface americana	6,9	5,5	3,4
Alface crespa	6,1	5,1	2,8
Rúcula	5,6	3,7	2,1
Média	6,35	4,98	3,0

A hortaliça que apresentou maior número de coliformes totais foi a alface americana (6,9 log₁₀ UFC.g⁻¹) seguida do agrião com 6,8 log₁₀ UFC.g⁻¹. LEITÃO *et al.* (1981), em pesquisa com alface das variedades lisa e manteiga, encontraram contagens semelhantes de coliformes totais, entre 6,0 e 7,0 log₁₀ UFC.g⁻¹. BERBARI *et al.* (2001) encontraram, em alface americana, na região de Campinas contagem deste microrganismo de 5,0 log₁₀ UFC.g⁻¹.

Em relação ao número de bolores e leveduras e de aeróbios psicrotróficos, o agrião apresentou a maior contagem: 5,62 e 3,70 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹, respectivamente. A rúcula apresentou as menores contagens dentre todos os microrganismos estudados, sendo 5,60; 3,70 e 2,10 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹, respectivamente, para coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos. Resultados próximos foram encontrados por BEUCHAT & BRACKETT (1990) em trabalho com alface do tipo *iceberg*, com contagens iniciais de bolores e leveduras no produto não sanitizado entre 3,0 e 5,0 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹, e aeróbios psicrotróficos entre 4,0 e 5,0 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹. BERBARI *et al.* (2001) encontraram contagens iniciais de bolores e leveduras de 4,0 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ em alface americana.

Os resultados deste trabalho em conjunto com trabalhos de outros autores levam a propor que as altas contagens de microrganismos contaminantes são rotineiras nos vegetais *in natura*, fato este que pode ser explicado pela qualidade da adubação, irrigação, manuseio e transporte, entre outras variáveis que podem influenciar na contaminação do produto.

Após enxágüe das hortaliças em água de rede de abastecimento (tratamento controle) houve redução média de um ciclo logarítmico (1,09 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹) na contagem de todos os microrganismos nas hortaliças analisadas como mostra a *Tabela 4*.

Tabela 4. Contagem microbiana média de hortaliças folhosas imediatamente após o segundo enxágüe em água da rede de abastecimento – (pós-enxágüe).

Produto	Coliformes Totais ($\log_{10}$ UFC.g ⁻¹)	Bolores e Leveduras ($\log_{10}$ UFC.g ⁻¹)	Aeróbios Psicrotróficos ($\log_{10}$ UFC.g ⁻¹)
Agrião	5,80	4,65	1,90
Alface americana	5,94	4,52	2,10
Alface crespa	5,01	3,99	1,76
Rúcula	4,61	2,76	1,19
Média	5,34	3,98	1,74

A redução microbiana pelo simples enxágüe é digna de nota, indicando a importância de redução da contaminação dos vegetais por meios físicos, servindo de processo auxiliar às etapas subseqüentes de descontaminação por meios químicos e reforçando-se como etapa importante na cadeia de produção dos minimamente processados.

Vários autores também observaram os mesmos efeitos do enxágüe nas populações de microrganismos de hortaliças. KIM *et al.* (1999), em pesquisa com alface minimamente processada, observaram redução de um ciclo logarítmico na população de bactérias mesofílicas após lavagem com água. BEHRSING *et al.* (2000) verificaram redução de 1,5 a 1,8 log na população de *E. coli* após lavagem de alface fresca apenas com água, estando em consonância aos resultados encontrados neste trabalho, onde a redução média no número de coliformes totais foi de 1,01 log₁₀ UFC.g⁻¹, de bolores e leveduras de 1,0 log₁₀ UFC.g⁻¹ e de aeróbios psicrotróficos de 1,26 log₁₀ UFC.g⁻¹. BERBARI *et al.* (2001), trabalhando com alface americana minimamente processada, obtiveram redução de dois ciclos logarítmicos na contagem de coliformes totais e de 1 ciclo na contagem de bolores e leveduras. RODGERS *et al.* (2004), após lavagem com água da rede de abastecimento em folhas de alface, verificaram redução de 1 log na população de *E. coli* e na de *L. monocytogenes*, bem como foi relatado por GOULARTE *et al.* (2004) redução de 1 log na população de *Enterobacteriaceae* após lavagem simples da alface minimamente processada com água.

As contagens microbianas médias antes e após o enxágüe podem ser verificadas na *Figura 4*.

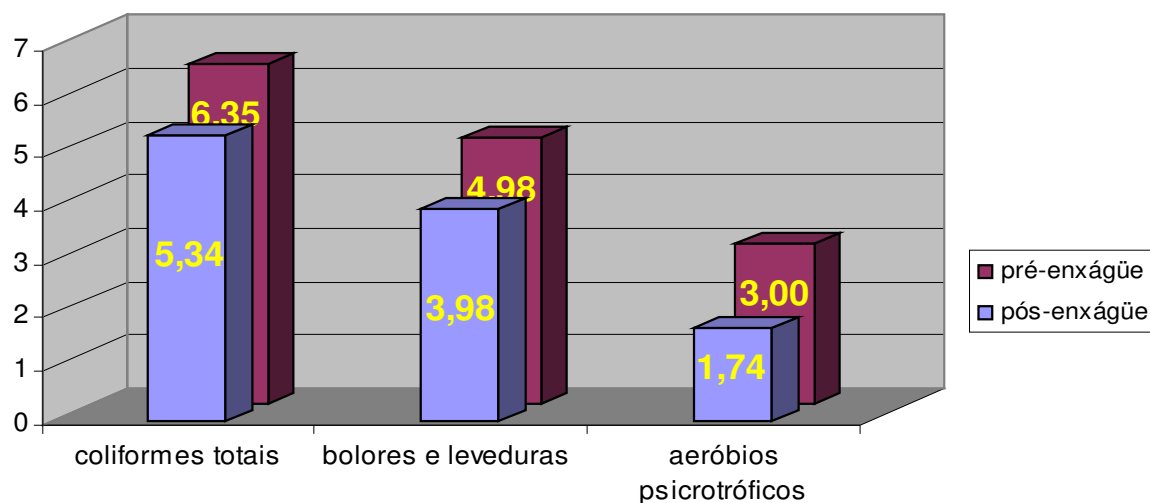


Figura 4. Contagens médias de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em hortaliças folhosas pré e pós-enxágüe.

5.2. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Agrião Minimamente Processado Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes

Ao se verificar a *Tabela 5*, o grupo controle apresentou uma redução na contagem de coliformes totais no dia 3, recuperando posteriormente e chegando a um valor de $6,23 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ no dia 8.

Tabela 5. Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em agrião minimamente processado antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração.

Amostras	Coliformes Totais (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)					Bolores e Leveduras (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)					Aeróbios Psicrotróficos (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)				
	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)			Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)			Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)		
	Pré- enxágüe	Pós- enxágüe	0	3	8	Pré- enxágüe	Pós- enxágüe	0	3	8	Pré- enxágüe	Pós- enxágüe	0	3	8
Pré-sanitização	6,8	5,8				5,62	4,65				3,7	1,9			
Controle			*	4,16	6,23			*	4,64	4,66			*	3,91	4,9
Cloro 100mg.L ⁻¹ .15min ⁻¹			3,8	3,9	5,97			4,41	5,25	5,86			2,1	2,8	2,99
Ozônio 0,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			2,78	3,17	5,16			2,68	3,48	3,9			2,43	2,58	2,9
Ozônio 1,0 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			2,17	2,96	4,98			2,1	2,15	3,16			1,17	2,25	2,89
Ozônio 1,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			1,16	2,25	4,07			2,39	2	3,18			1,87	1,96	1,9

Obs: * o grupo controle sofreu apenas uma análise (após o segundo enxágüe) antes de seguir para o armazenamento, devendo-se considerar o mesmo valor para o resultado de análise do dia 0.

Em relação aos grupos que sofreram processos sanitizantes, o grupo tratado com cloro revelou uma redução de dois ciclos logarítmicos em sua contagem de coliformes totais, imediatamente após o processo, o ozônio a 0,5 mg.L⁻¹ obteve uma maior redução (3,02 ciclos logarítmicos) que o cloro seguido pelo grupo tratado por ozônio 1,0 mg.L⁻¹, cuja redução foi de 3,63 ciclos logarítmicos.

O tratamento por ozônio 1,5 mg.L⁻¹ causou a maior redução de coliformes totais no agrião, imediatamente após o processo (4,64 ciclos logarítmicos) e manteve a menor contagem entre os demais tratamentos ao final do período de análise 4,07 log₁₀ UFC.g⁻¹, 1,73 ciclos logarítmicos abaixo da contagem imediatamente antes do tratamento sanitizante. Durante todo o período, mesmo com a redução da diferença entre as contagens de microrganismos entre os diferentes tratamentos, a contaminação das hortaliças tratadas pelos grupos ozônio manteve-se abaixo do grupo tratado por cloro em qualquer uma das concentrações, conforme *Figura 5*.

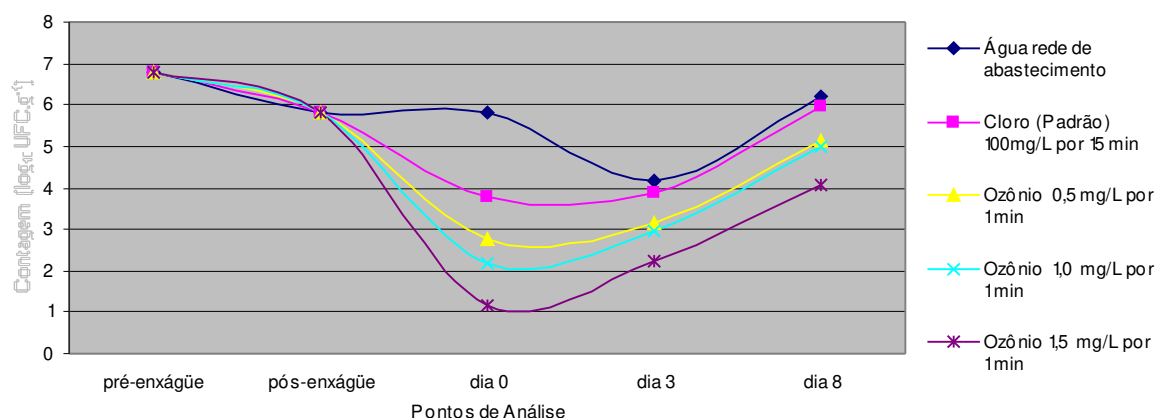


Figura 5. População de coliformes totais em agrião minimamente processado sujeito a diferentes processos de sanitização.

Já em relação aos bolores e leveduras, o grupo controle apresentou uma variação mínima em sua população durante todo o período, permanecendo com contagens em torno de 4,64 a 4,66 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ até o dia 8, conforme *Tabela 5*. Entre os grupos que sofreram processo de sanitização, as reduções na população de bolores e leveduras verificadas imediatamente após os tratamentos variaram de 0,24 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ (cloro) até 2,55 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ (ozônio a 1,0 mg.L⁻¹).

Durante o período de manutenção dos produtos sob refrigeração, o grupo submetido ao tratamento controle praticamente não apresentou crescimento de sua população (ver *Figura 6*). Dentre as hortaliças sanitizadas, o grupo tratado com cloro apresentou o maior crescimento de bolores e leveduras, chegando ao final do período a 5,86 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ – a maior contaminação encontrada entre os tratamentos ao final do período. O grupo tratado com ozônio 1,0 mg.L⁻¹ manteve o menor crescimento destes microrganismos durante a estocagem, com contagem no dia 8 de 3,16 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹.

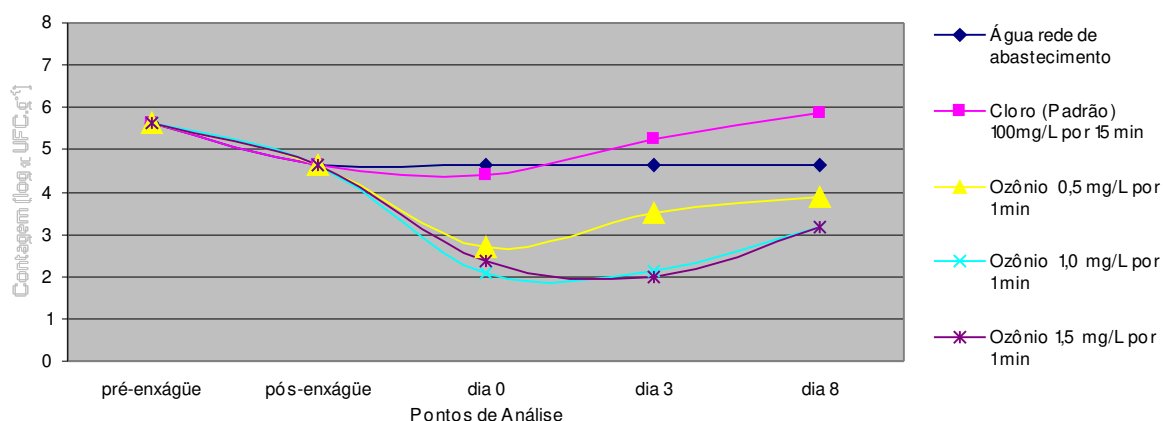


Figura 6. População de bolores e leveduras em agrião minimamente processado sujeito a diferentes processos de sanitização.

Com relação aos microrganismos aeróbios psicrotróficos, o grupo controle apresentou uma variação de crescimento de três ciclos logarítmicos, saindo de uma contagem de $1,9 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, chegando a atingir $4,9 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ no dia 8, como pode ser verificado na *Tabela 5*.

Dentre os grupos que sofreram tratamentos sanitizantes, os microrganismos psicrotróficos apresentaram um comportamento inesperado onde os grupos tratados por cloro e ozônio a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram um maior crescimento populacional, imediatamente após a sanitização (*Figura 7*), o grupo tratado por ozônio a $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ se manteve praticamente estável e o único que apresentou redução das contagens foi o ozônio a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, com uma pequena redução de 0,73 ciclos logarítmicos. O grupo tratado com ozônio a $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, entretanto, foi o que apresentou a menor contagem deste microrganismo no dia 8 ($1,9 \text{ mg.L}^{-1}$).

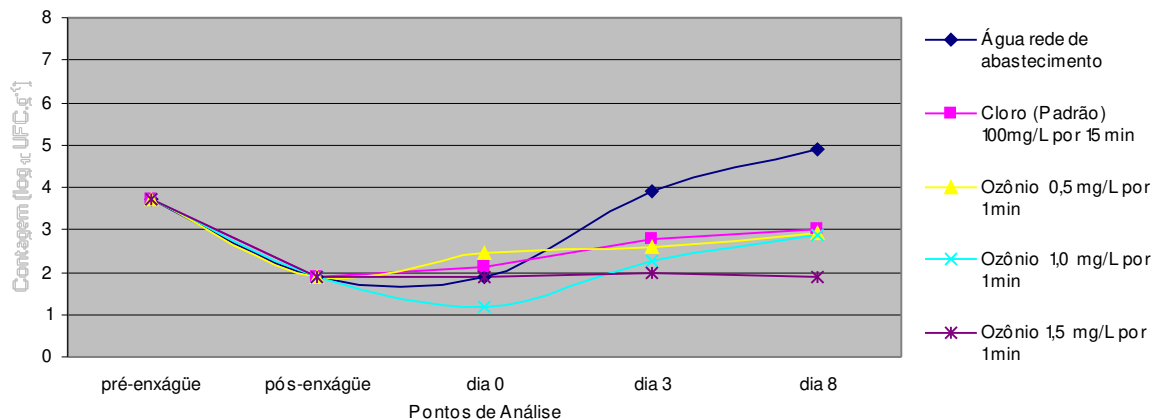


Figura 7. População de microrganismos aeróbios psicrotróficos em agrião minimamente processado sujeito a diferentes processos de sanitização.

Dentre todos, o grupo controle apresentou a maior população de aeróbios psicrotróficos ao final do período, com contagem de $4,9 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ seguido pelo grupo tratado por cloro ($2,99 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$).

5.3. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Alface Americana Minimamente Processada Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes

Nas pesquisas de coliformes totais, o grupo controle de alface americana apresentou no dia 3 um decréscimo de 2,05 ciclos logarítmicos em relação à contagem imediatamente após a lavagem, conforme *Tabela 6*.

Tabela 6. Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em alface americana minimamente processada antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração.

Amostras	Coliformes Totais (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)			Bolores e Leveduras (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)			Aeróbios Psicrotróficos (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)		
	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)
	Pré- enxágüe	Pós- enxágüe		Pré- enxágüe	Pós- enxágüe		Pré- enxágüe	Pós- enxágüe	
Pré-sanitização	6,90	5,94		5,50	4,52		3,40	2,10	
Controle			* 3,89 5,61			* 3,93 4,82			* 4,03 4,98
Cloro 100mg.L ⁻¹ .15min ⁻¹			2,1 2,7 2,99			2 2,49 2,86			0,97 1,06 1,1
Ozônio 0,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			4,32 3,97 5,46			2,69 2,76 3,30			1,02 1,12 1,15
Ozônio 1,0 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			2,69 2,76 2,9			2 2,13 2,16			0,94 0,98 1,07
Ozônio 1,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			1,17 1,25 1,89			2,09 2,12 2,15			0,91 0,95 0,99

Obs: * o grupo controle sofreu apenas uma análise (após o segundo enxágüe) antes de seguir para o armazenamento, devendo-se considerar o mesmo valor para o resultado de análise do dia 0.

O grupo tratado com cloro sofreu uma redução inicial na população de coliformes totais de quase quatro ciclos logarítmicos (3,84 log₁₀UFC.g⁻¹), mantendo uma redução de aproximadamente três ciclos logarítmicos (2,95 log₁₀UFC.g⁻¹) até o final do armazenamento refrigerado. O mesmo tratamento, na população de bolores e leveduras, acarretou na redução média de dois ciclos logarítmicos (2,07 log₁₀UFC.g⁻¹) até o final do período. Tais resultados podem ser observados em trabalho de BERBARI *et al.* (2001) com alface americana minimamente processada, onde após tratamento com cloro a 100 e a 130 mg.L⁻¹, houve reduções nas populações de coliformes totais e de bolores e leveduras em três e dois ciclos logarítmicos, respectivamente. Ocorrendo também com GOULARTE *et al.* (2004) que trataram alface americana minimamente processada com cloro a 200 mg.L⁻¹ por 15 minutos, obtendo redução de 2 log na população de *Enterobacteriaceae*.

O grupo tratado com ozônio 1,5 mg.L⁻¹ apresentou uma redução de 4,77 ciclos logarítmicos na população de coliformes totais logo após a sanitização - a maior redução da população após sanitização dentre todos os tratamentos (Tabela 6 e Figura 8).

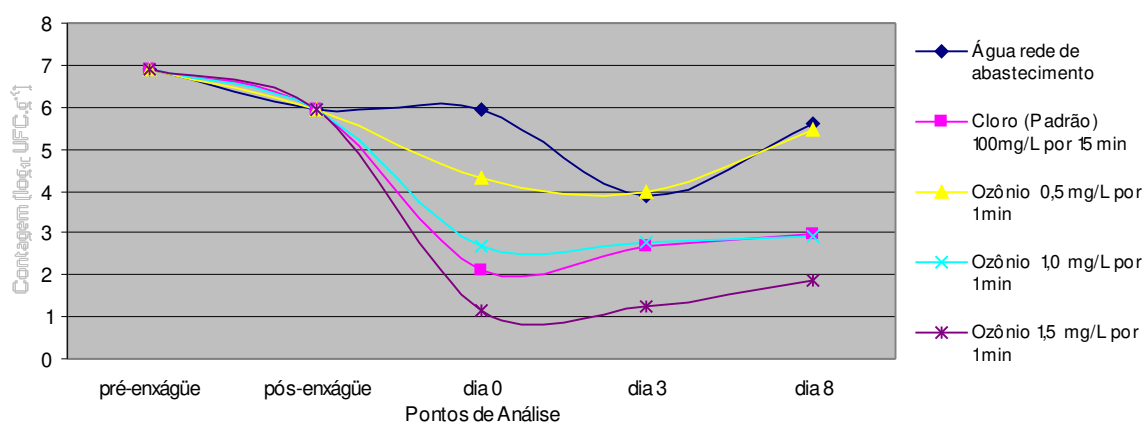


Figura 8. População de coliformes totais em alface americana minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

O grupo controle dos bolores e leveduras apresentou uma pequena redução de 0,59 ciclos logarítmicos no dia 3, porém obteve uma recuperação desta população ao final do período com contagem de $4,82 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, 0,30 ciclos logarítmicos maior que a contagem presente no início, como se verifica na Figura 9.

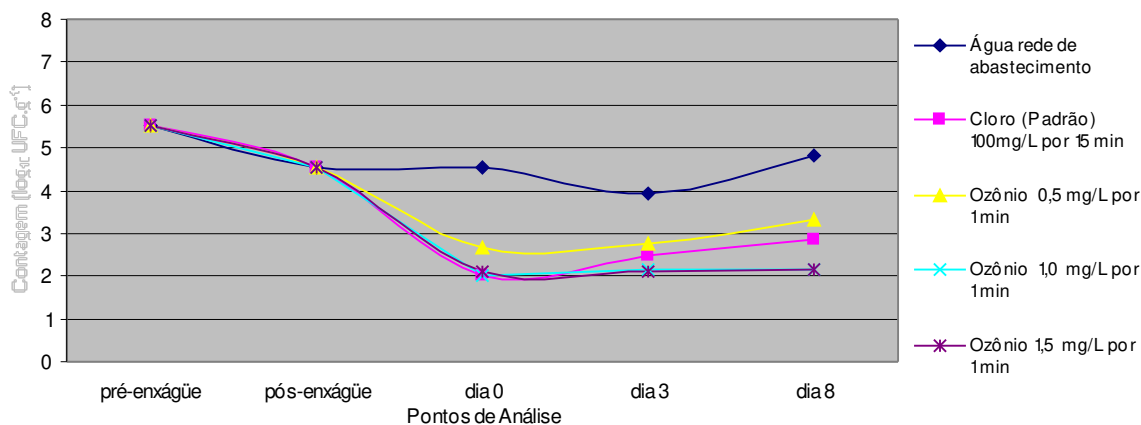


Figura 9. População de bolores e leveduras em alface americana minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

Considerando as hortaliças que sofreram sanitização, os grupos tratados com cloro e ozônio $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ tiveram ação semelhante na redução da população de bolores e leveduras imediatamente após a sanitização, com redução de 2,52 ciclos, atingindo a contagem de $2 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$. As contagens do dia 3 mostram o grupo tratado por cloro com uma população já maior que o grupo tratado por ozônio $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no mesmo período (*Figura 9*). Esta diferença no crescimento da população continuou até o dia 8 com o grupo tratado por cloro apresentando contagem de $2,86 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ e o grupo tratado por ozônio $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, uma contagem de $2,16 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, diferença de 0,70 ciclos logarítmicos.

Em relação aos microrganismos aeróbios psicrotróficos (*Tabela 6 e Figura 10*) o grupo controle obteve um crescimento de 2,88 ciclos logarítmicos durante o tempo de análise atingindo $4,98 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$. Os demais grupos tiveram, logo após a sanitização, uma redução média de $1,14 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, sofrendo pouca variação durante todo o período, mantendo os valores próximos aos do dia zero.

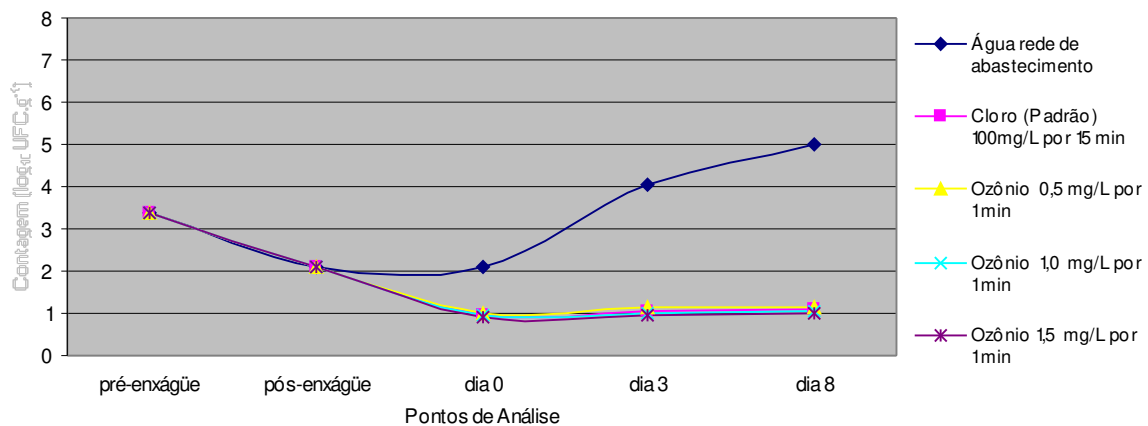


Figura 10. População de microrganismos aeróbios psicrotróficos em alface americana minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

5.4. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Alface Crespa Minimamente Processada Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes

No estudo dos coliformes totais, o grupo controle apresentou um aumento considerável em sua população durante os dias de análise, inicialmente, com população de $5,01 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ imediatamente após a lavagem (dia 0), atingindo valores de $7,65 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ no dia 8, uma variação de +2,64 ciclos logarítmicos, como pode ser verificado na *Tabela 7*.

Tabela 7. Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em alface crespa minimamente processada antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração.

Amostras	Coliformes Totais ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)					Bolores e Leveduras ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)					Aeróbios Psicrotróficos ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)				
	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)			Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)			Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)		
	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8
Pré-sanitização	6,1	5,01				5,1	3,99				2,8	1,76			
Controle			*	5,8	7,65			*	4,62	4,67			*	3,97	4,78
Cloro 100mg.L ⁻¹ .15min ⁻¹			3,78	3,92	5,98			4,45	5,29	5,89			2,11	2,89	2,9
Ozônio 0,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			3,51	3,18	5,18			2,67	3,76	3,91			2,45	2,57	2,93
Ozônio 1,0 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			2,19	2,86	4,94			2,08	2,12	3,18			1,16	2,27	2,87
Ozônio 1,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			1,15	2,27	4,06			2,28	2,01	3,17			1,89	1,97	1,78

Obs: * o grupo controle sofreu apenas uma análise (após o segundo enxágüe) antes de seguir para o armazenamento, devendo-se considerar o mesmo valor para o resultado de análise do dia 0.

O tratamento com ozônio 1,5 mg.L⁻¹ foi o responsável pela maior redução na população de coliformes totais, atingindo uma contagem de $1,15 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ imediatamente após a ozonização. Este mesmo tratamento manteve a menor população do microrganismo em questão em relação aos demais até o dia 8 apresentando, neste dia, $4,06 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, i.e., 1,92 ciclos logarítmicos abaixo da contagem do grupo tratado com cloro e 3,59 ciclos logarítmicos abaixo do grupo controle, no mesmo período (*Figura 11*).

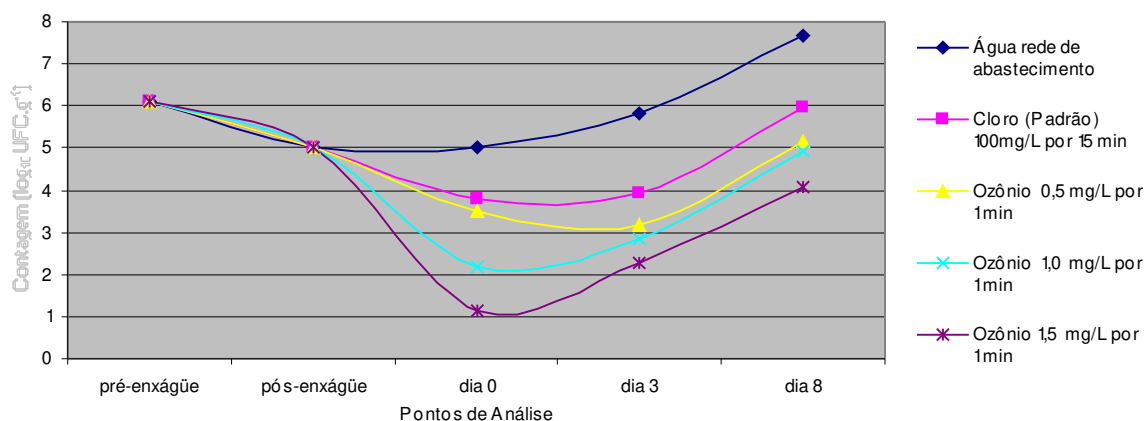


Figura 11. População de coliformes totais em alface crespa minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

Em relação à pesquisa de bolores e leveduras (*Figura 12 e Tabela 7*) o grupo controle apresentou um crescimento de 0,68 ciclos logarítmicos durante todo o período, atingindo contagem de $4,67 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ no dia 8.

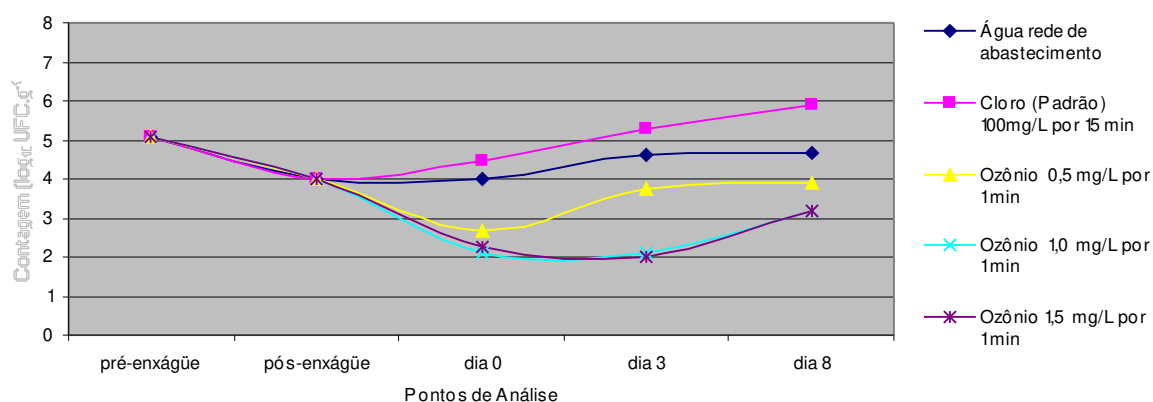


Figura 12. População de bolores e leveduras em alface crespa minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

A sanitização com cloro permitiu o crescimento da população de bolores e leveduras de 0,46 ciclos logarítmicos, atingindo contagens de $4,45 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, logo após o tratamento. Apresentando, a partir daí, variação de +1,44 ciclos

logarítmicos até o final do período de análise atingindo contagem de $5,89 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, ou seja, o tratamento com cloro acarretou num aumento populacional médio de 1,22 log.

Os tratamentos de ozônio 1,0 e 1,5 mg.L^{-1} tiveram redução logo após a sanitização de 1,91 e 1,71 ciclos, respectivamente, sendo que no dia 8 apresentavam contagens muito próximas, de respectivamente 3,18 e 3,17 $\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$.

Com relação aos aeróbios psicrotróficos (*Figura 13 e Tabela 7*) o grupo controle apresentou uma elevação considerável de sua população durante todo o período, havendo um aumento de 2,21 ciclos logarítmicos até o dia 3. Chegando à contagem de $4,78 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ no dia 8, um aumento de 3,02 ciclos logarítmicos comparado com o número da contagem obtida imediatamente após o enxágüe.

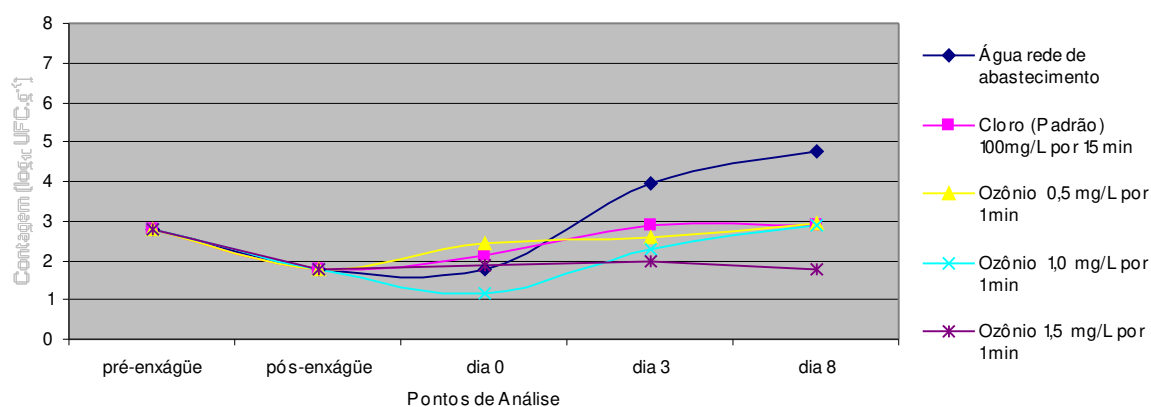


Figura 13. População de microrganismos aeróbios psicrotróficos em alface crespa minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

Os grupos de aeróbios psicrotróficos submetidos à sanitização revelaram uma tendência inesperada: todos os tratamentos (exceto o ozônio 1,0 mg.L^{-1}) acarretaram no aumento da população destes microrganismos imediatamente após a sanitização. Os grupos cuja população de psicrotróficos foi mais beneficiada em seu crescimento foram os tratados por ozônio 0,5 mg.L^{-1} e cloro,

que apresentaram variação positiva, respectivamente, de 0,69 e 0,35 ciclos logarítmicos na sua população, logo após a sanitização. O tratamento com cloro acarretou em aumento médio de $0,87 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ nesta população.

Ao final do período de análise as amostras sanitizadas permaneceram com contagens em torno de 2,87 a $2,93 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, enquanto que o ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ manteve contagens de $1,78 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$.

5.5. Comportamento dos Microrganismos Contaminantes de Rúcula Minimamente Processada Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes

A Tabela 8 mostra as variações nas populações dos diferentes microrganismos pesquisados na rúcula minimamente processada.

Tabela 8. Contagens de coliformes totais, bolores e leveduras e aeróbios psicrotróficos em rúcula minimamente processada antes e após diferentes tratamentos de sanitização e durante manutenção em temperatura de refrigeração.

Amostras	Coliformes Totais ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)					Bolores e Leveduras ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)					Aeróbios Psicrotróficos ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)				
	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)			Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)			Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)		
	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8
Pré-sanitização	5,6	4,61				3,7	2,76				2,1	1,19			
Controle			*	5,89	7,61			*	4,61	4,66			*	3,9	4,91
Cloro $100 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$			3,23	3,51	4,99			4,4	5,23	5,85			2,08	2,63	2,98
Ozônio $0,5 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 1 \text{ min}^{-1}$			3,54	3,96	5,46			2,7	3,78	3,99			2,44	2,64	2,72
Ozônio $1,0 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 1 \text{ min}^{-1}$			2,35	2,81	4,27			1,99	2,14	3,15			2,23	2,26	2,88
Ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 1 \text{ min}^{-1}$			1,14	1,92	3,93			2,37	2,04	3,06			1,88	1,95	1,84

Obs: * o grupo controle sofreu apenas uma análise (após o segundo enxágüe) antes de seguir para o armazenamento, devendo-se considerar o mesmo valor para o resultado de análise do dia 0.

Na pesquisa de coliformes totais (*Figura 14 e Tabela 8*) verifica-se que o grupo controle obteve um aumento de três ciclos logarítmicos, chegando a $7,61 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ no dia 8.

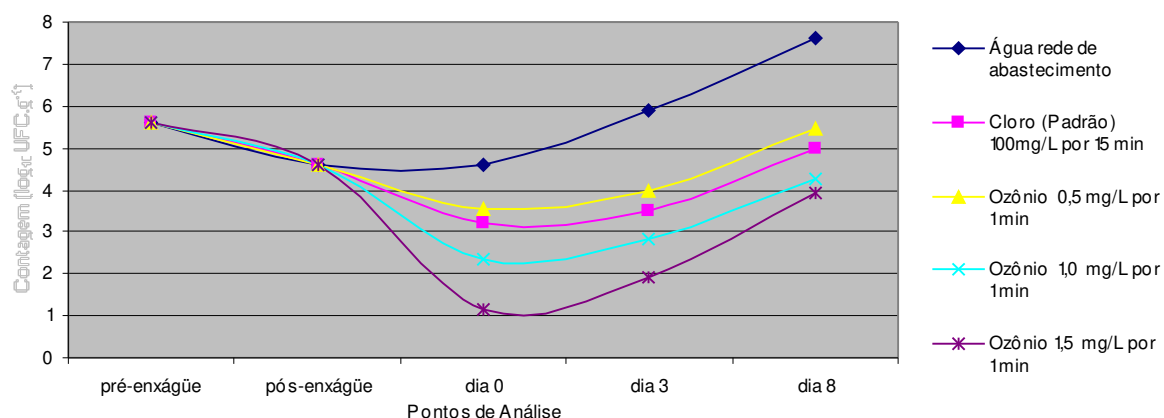


Figura 14. População de coliformes totais em rúcula minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

O ozônio a $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ promoveu a maior redução dos coliformes totais, atingindo $1,14 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, imediatamente após o tratamento de sanitização, portanto, com uma redução de 3,47 ciclos logarítmicos. Apresentando a menor população entre todos os tratamentos ($3,93 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$) também no final do período.

Na pesquisa de bolores e leveduras (*Figura 15 e Tabela 8*) o grupo controle apresentou aumento de 1,9 ciclos logarítmicos em todo o período, estando no início com $2,76 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ e atingindo contagem de $4,66 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ no dia 8.

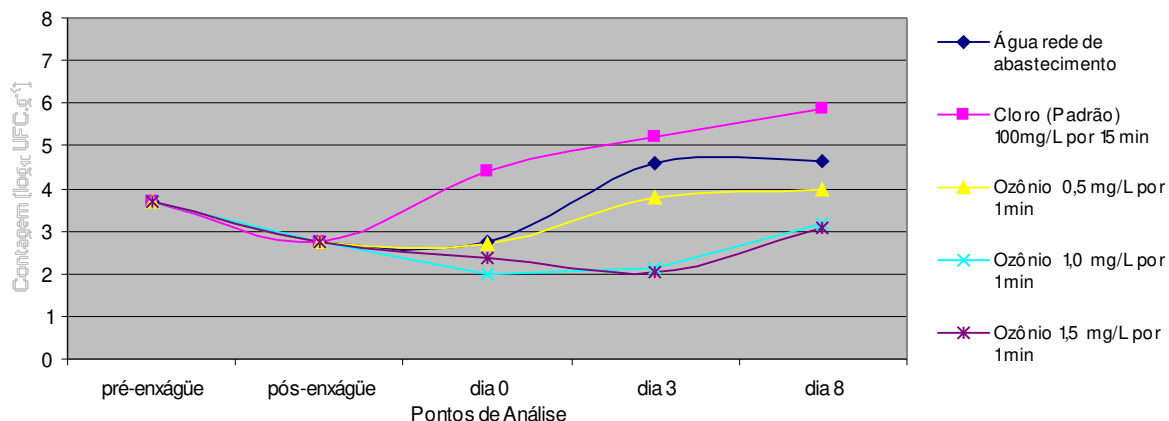


Figura 15. População de bolores e leveduras em rúcula minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização.

A população de bolores e leveduras teve comportamento variado de acordo com o método de sanitização. Enquanto o ozônio $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ conseguiu reduzir em 0,77 ciclos logarítmicos a contagem dos microrganismos imediatamente após o tratamento, as hortaliças submetidas ao cloro tiveram sua população aumentada em 1,64 ciclos logarítmicos neste mesmo período. Ainda o cloro foi o tratamento que permitiu a maior contaminação da rúcula por estes microrganismos, no dia 8 atingindo $5,85 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, contagem acima até do grupo controle no mesmo período ($4,66 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$).

A contagem de aeróbios psicotróficos de todos os grupos sanitizados (*Figura 16*) aumentou após o tratamento. Dentre eles, o ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ foi o que obteve maior ação inibitória sobre a contaminação das hortaliças como um todo, apresentando a menor contagem no dia 8 ($1,84 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ contra $2,98 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ do grupo cloro).

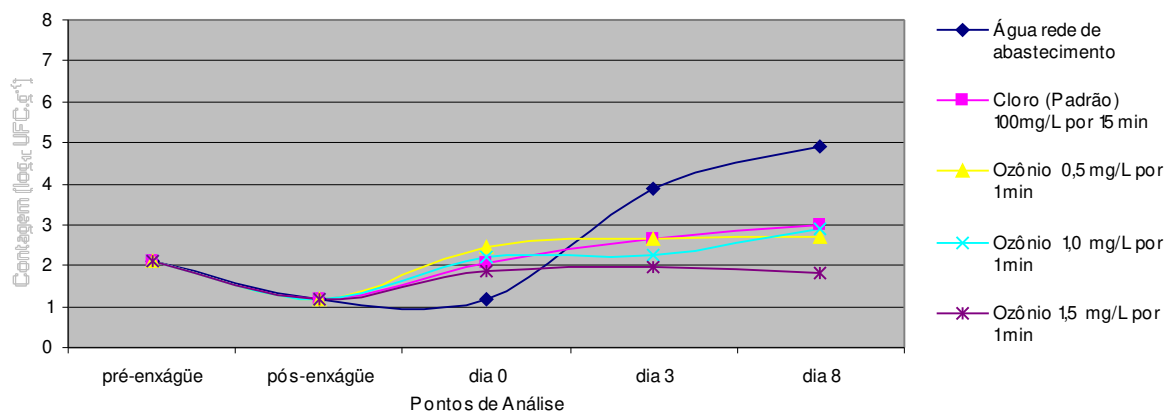


Figura 16. População de microrganismos aeróbios psicotróficos em rúcula minimamente processada sujeita a diferentes processos de sanitização

5.6. Pesquisa de *Salmonella* spp. nas Diferentes Amostras Avaliadas

Neste trabalho, em nenhuma das amostras estudadas foram encontradas bactérias do gênero *Salmonella*, nas amostras recém recebidas, tampouco nas amostras processadas. TAKAYANAGUI *et al.* (2001), analisando 172 amostras de hortaliças frescas adquiridas em pontos de venda na região de Ribeirão Preto (SP), verificaram a presença de salmonela em 9%. RUIZ *et al.* (1987) isolaram o mesmo microrganismo em 5% de amostras, em estudo com 80 unidades de alface de diferentes procedências (granjas e supermercados). PAULA *et al.* (2003), entretanto, em pesquisa com alfaces processadas oriundas de restaurantes na cidade de Niterói (RJ), não encontraram salmonela. Fatores como o solo, tipo de adubação, fonte de irrigação, boas práticas de manejo e transporte da fonte produtora até a indústria e boas práticas de fabricação durante o processamento mínimo são determinantes para o acesso do microrganismo às hortaliças.

Condições favoráveis de produção no campo e transporte podem ter restringido o acesso da salmonela ao produto. Somando-se à isto a competição populacional por outros grupos de microrganismos presentes nas amostras antes do processamento mínimo podem ter influenciado no não isolamento da bactéria no presente estudo.

5.7. Comportamento Geral dos Microrganismos Contaminantes Frente aos Diferentes Tratamentos Sanitizantes

A *Tabela 9* apresenta a média das contagens de coliformes totais de todas as hortaliças analisadas. Os grupos controle tiveram um crescimento médio de 1,44 ciclos logarítmicos durante todo o período, partindo de contagem de 5,34 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ no dia 0, chegando a 6,78 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ ao final deste período, como se verifica na *Tabela 9* e *Figura 17*.

Tabela 9. Contagens médias de coliformes totais frente aos diferentes processos de sanitização e manutenção em temperatura de refrigeração.

Coliformes Totais (log ₁₀ UFC.g ⁻¹)					
Médias dos tratamentos	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)		
	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8
Pré-sanitização	6,35	5,34			
Controle			*	4,94	6,78
Cloro 100mg.L ⁻¹ .15min ⁻¹			3,23	3,51	4,98
Ozônio 0,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			3,54	3,57	5,32
Ozônio 1,0 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			2,35	2,85	4,27
Ozônio 1,5 mg.L ⁻¹ .1min ⁻¹			1,16	1,92	3,49

Obs: * o grupo controle sofreu apenas uma análise (após o segundo enxágüe) antes de seguir para o armazenamento, devendo-se considerar o mesmo valor para o resultado de análise do dia 0.

Ainda em relação aos coliformes totais, considerando-se a redução na contagem média dos grupos sanitizados, o processo de maior efetividade foi a sanitização por ozônio 1,5 mg.L⁻¹, com redução de 4,18 ciclos logarítmicos, logo após a sanitização, seguido pelo tratamento por ozônio 1,0 mg.L⁻¹, com redução de 2,99 ciclos. Vale lembrar que, à exceção do grupo ozônio 0,5 mg.L⁻¹, todos os demais grupos tratados pelo ozônio mantiveram contagens menores que o grupo tratado por cloro em pelo menos 0,71 ciclos logarítmicos e pelo menos 2,51 ciclos logarítmicos menor que o grupo controle, no dia 8.

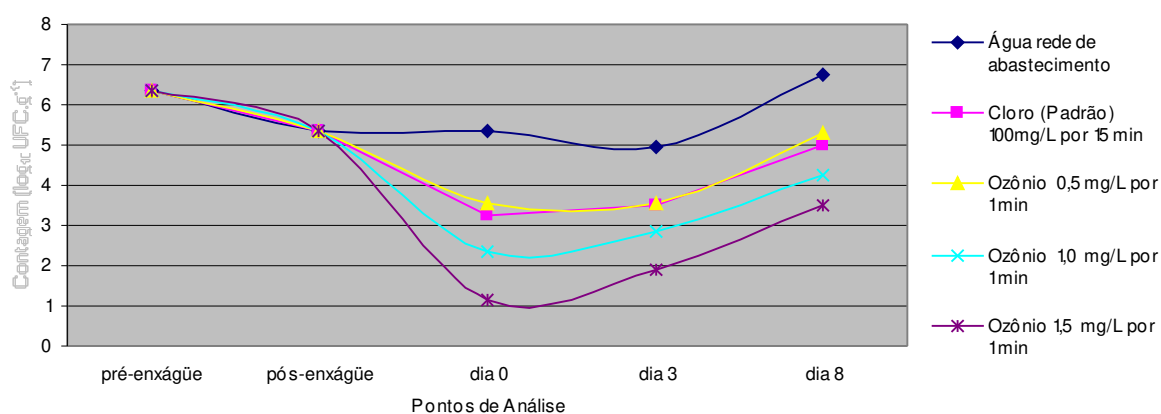


Figura 17. População média de coliformes totais frente aos diferentes processos de sanitização.

No dia 8 os grupos tratados por ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ mantiveram a menor contagem média de coliformes totais com $3,49 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, sendo 1,49 ciclos logarítmicos menor que a contaminação encontrada no grupo tratado por cloro e 3,29 ciclos menor que a contagem do grupo controle, no mesmo período.

Verifica-se, na *Tabela 10* e *Figura 18*, um crescimento reduzido de bolores e leveduras nos grupos controle, partindo de contagem inicial no dia 0 de $3,98 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, atingindo $4,70 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ no dia 8, um acréscimo populacional de 0,72 ciclos logarítmicos.

Tabela 10. Contagens médias de bolores e leveduras frente aos diferentes processos de sanitização e manutenção em temperatura de refrigeração.

Bolores e Leveduras ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$)					
Médias dos tratamentos	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)		
	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3	8
Pré-sanitização	4,98	3,98			
Controle			*	4,45	4,70
Cloro $100 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$			3,82	4,57	5,12
Ozônio $0,5 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 1 \text{ min}^{-1}$			2,69	3,45	3,78
Ozônio $1,0 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 1 \text{ min}^{-1}$			2,04	2,14	2,91
Ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 1 \text{ min}^{-1}$			2,28	2,04	2,89

Obs: * o grupo controle sofreu apenas uma análise (após o segundo enxágüe) antes de seguir para o armazenamento, devendo-se considerar o mesmo valor para o resultado de análise do dia 0.

Dentre os grupos que sofreram processo de sanitização, o tratamento por ozonização a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ promoveu um decréscimo, logo após a sanitização, na contagem dos bolores e leveduras em 1,94 ciclos logarítmicos, a maior redução da contaminação de bolores e leveduras das hortaliças, seguido pelo tratamento por ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, com redução de 1,70 ciclos.

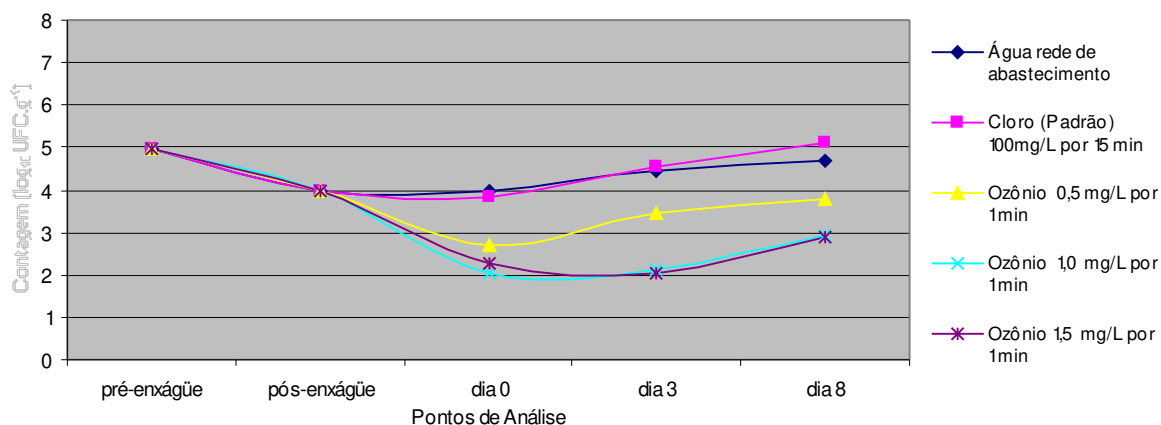


Figura 18. População média de bolores e leveduras frente aos diferentes processos de sanitização.

A ação limitada do cloro sobre bolores e leveduras fica evidenciada pela redução nas contagens em apenas 0,16 ciclos logarítmicos, logo após a sanitização, apresentando a maior taxa de crescimento durante todo o período (1,30 ciclos logarítmicos) e atingindo, no dia 8, contagem de $5,12 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$. Contagens semelhantes de bolores e leveduras em alface, repolho e aipo minimamente processados foram encontradas por TOURNAS (2005) que, analisando amostras do varejo, encontrou contagens em torno de 4 a $5 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$.

O grupo tratado por ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentou a menor contagem média ao final do dia 8 ($2,89 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$), 2,23 ciclos logarítmicos menor que o grupo tratado por cloro no mesmo período.

O tratamento por ozônio mostra uma ação mais efetiva que o cloro sobre esta classe de microrganismos, em especial os tratamentos com concentrações de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$. KIM *et al.* (1999) confirmam a efetividade do ozônio como agente sanitizante sobre bolores e leveduras, descrevendo taxas de redução semelhantes para estes microrganismos.

Observa-se na *Tabela 11* e *Figura 19* que o grupo controle dos aeróbios psicrotróficos obteve média de crescimento de 3,15 ciclos logarítmicos, atingindo $4,89 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ no dia 8.

Tabela 11. Contagens médias de microrganismos aeróbios psicrotróficos frente aos diferentes processos de sanitização e manutenção em temperatura de refrigeração.

Aeróbios Psicrotróficos ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)				
Médias dos tratamentos	Pré-sanitização		Armazenamento pós-sanitização (dias)	
	Pré-enxágüe	Pós-enxágüe	0	3
Pré-sanitização	3,00	1,74		
Controle			*	3,95
Cloro $100 \text{ mg.L}^{-1}.15\text{min}^{-1}$			1,82	2,35
Ozônio $0,5 \text{ mg.L}^{-1}.1\text{min}^{-1}$			2,09	2,23
Ozônio $1,0 \text{ mg.L}^{-1}.1\text{min}^{-1}$			1,38	1,94
Ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}.1\text{min}^{-1}$			1,64	1,71

Obs: * o grupo controle sofreu apenas uma análise (após o segundo enxágüe) antes de seguir para o armazenamento, devendo-se considerar o mesmo valor para o resultado de análise do dia 0.

Os diferentes processos de sanitização revelaram um comportamento inesperado dos aeróbios psicrotróficos onde apenas os tratamentos por ozônio a $1,0$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ conseguiram reduzir a contaminação por estes microrganismos, e ainda assim, reduções de 0,36 e 0,10 ciclos logarítmicos, respectivamente, logo após a sanitização. Os demais grupos (tratados com cloro e ozônio $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) apresentaram aumento na contaminação, logo após a sanitização. Tratamento com cloro a $200\text{-}250 \text{ mg.L}^{-1}$ por BEUCHAT & BRACKETT (1990) não se mostrou eficiente na redução da população de aeróbios psicrotróficos, confirmando os resultados encontrados neste trabalho.

Durante todo o período de análise o grupo tratado por ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ manteve contagem em torno de $1,63$ a $1,71 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ e ao final deste período, manteve a menor contaminação pelos aeróbios psicrotróficos ($1,63 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$), sendo que a taxa média de crescimento entre os grupos sanitizados, manteve-se em níveis discretos, não ultrapassando 0,5 log até o final do período.

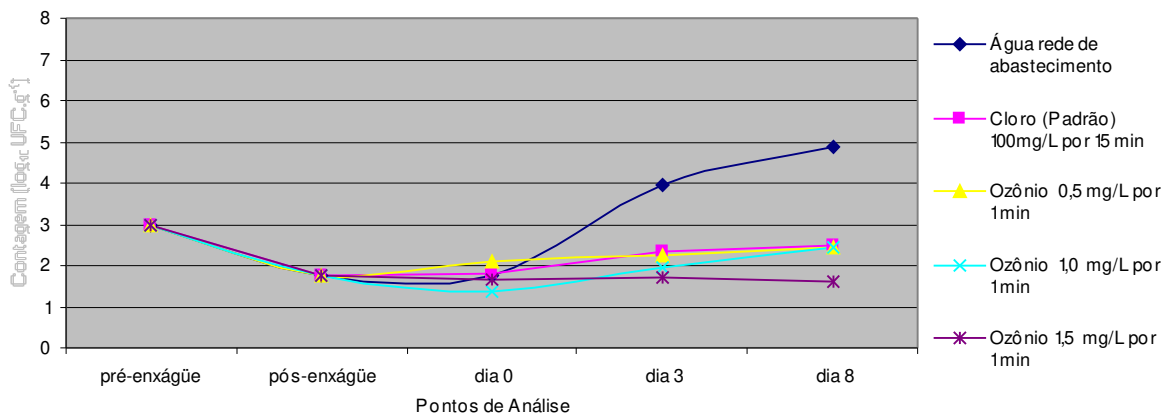


Figura 19. População média de microrganismos aeróbios psicrotróficos frente aos diferentes processos de sanitização.

O aumento importante da contaminação deste grupo de microrganismos após o tratamento controle durante todo o período, sugere a capacidade de crescimento deste mesmo grupo, quando em sua temperatura ótima de crescimento e sem a atuação inibitória dos sanitizantes.

Se tomarmos em linhas gerais, no caso específico dos microrganismos aeróbios psicrotróficos, todos os grupos que sofreram sanitização tiveram comportamento semelhante, quando observadas as curvas de crescimento populacional, havendo um aumento muito discreto da população durante o período de manutenção sob refrigeração, com exceção do grupo tratado por ozônio 1,5 mg.L⁻¹, que manteve a população sem variações relevantes até o final do período de análise.

Os compostos clorados são os sanitizantes mais difundidos no tratamento de hortaliças minimamente processadas no mercado devido, entre outros motivos, ao seu baixo custo e fácil manuseio. Sob o ponto de vista microbiológico, no entanto, o ozônio torna-se uma alternativa promissora para a indústria de processamento de hortaliças, uma vez que este estudo mostra que, em concentrações adequadas (a partir de 1,0 mg.L⁻¹) o gás permite inicialmente uma redução importante no grau de contaminação de coliformes totais e bolores e leveduras, e posteriormente,

uma manutenção da contaminação em níveis menores que as das hortaliças tratadas pelo cloro, durante o tempo de manutenção dos produtos sob refrigeração.

A operação de sanitização durante o processamento mínimo é um dos fatores determinantes na manutenção da qualidade e sanidade do produto, porém outros fatores podem ser considerados, desde a obtenção da matéria-prima de boa qualidade, o que inclui cuidados quanto à nutrição mineral, controle fitossanitário, manejo da água e do solo, além da necessidade da realização da colheita no seu ponto ótimo de maturidade. Ainda são importantes a utilização de água de boa qualidade, limpeza e sanitização criteriosa e efetiva dos equipamentos e utensílios, utilização de vestimentas adequadas pelos colaboradores, conscientização dos mesmos sobre a adequada manipulação dos produtos e a distribuição dos produtos processados feita de maneira rápida, respeitando-se a cadeia do frio até o consumidor final. Todos estes fatores contribuem significativamente para a segurança alimentar do consumidor – objetivo final de todo processo sanitizante, evitando assim, prejuízos econômicos decorrentes de toxinfecções alimentares, promovendo a confiança do consumidor nestes produtos e contribuindo para o sucesso do negócio.

5.8. Análise Sensorial

Os resultados da análise sensorial para a alface americana minimamente processada podem ser verificados na *Tabela 12*.

Tabela 12: Média das notas sensoriais de alface americana minimamente processada

Atributos	DIA 0					DIA 3					DIA 8				
	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)
Cor verde	a 2,60	a 2,11	a 1,77	a 2,53	a 2,07	a 3,40	a 3,21	a 3,27	a 4,59	a 3,51	a 3,56	a 2,83	a 2,33	a 3,34	a 3,84
Cor amarela	a 2,24	a 3,00	a 2,34	a 2,29	a 1,86	a 1,91	b 2,59	c 3,37	ab 2,26	d 4,50	a 3,24	a 4,83	a 4,77	a 3,24	a 3,46
Aroma	a 6,96	a 6,81	a 6,50	a 7,01	a 7,06	a 7,89	a 7,80	a 6,59	a 7,69	a 6,89	a 5,86	a 5,69	b 2,99	a 5,97	a 5,83
Textura (não oral)	a 6,81	ab 6,31	b 5,53	ab 6,33	a 6,73	a 6,19	a 6,21	bc 4,47	ab 5,69	ac 5,49	a 6,40	a 6,60	a 5,37	a 7,07	a 6,60

Obs: amostras indicadas por mesmas letras na mesma linha e no mesmo dia de análise não diferem significativamente ao nível de erro de 5%.

As amostras de alface americana não apresentaram diferença significativa em relação à cor verde entre os tratamentos considerados no mesmo dia de análise. Ocorrendo o mesmo com relação à cor amarela, exceto no dia 3, quando houve maior percepção deste atributo nos grupos tratados por ozônio a 0,5 e 1,5 mg.L⁻¹. Neste mesmo dia o tratamento com ozônio a 1,0 mg.L⁻¹ mostrou ser o que menos contribuiu para o amarelecimento das amostras, conforme pode ser observado na *Tabela 12*.

Nota-se que o atributo cor verde, de um modo geral, não sofreu variação relevante após os diferentes tratamentos empregados.

Os diferentes tratamentos exerceram pouca influência em relação à cor amarela, de um modo geral.

Em relação ao atributo aroma todos os grupos de alface americana mantiveram médias sem diferenças significativas entre si dentro de um mesmo dia de análise, nos dias analisados, exceto no dia 8, onde amostras tratadas por ozônio a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Neste dia já se observa uma perda do aroma característico da hortaliça em questão em todos os tratamentos utilizados, embora o tratamento com ozônio a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ tenha apresentado a menor nota entre eles. A literatura indica que reações oxidativas exercem papel importante nas alterações deste atributo durante a vida-de-prateleira de hortaliças. Segundo HILDEBRAND (1989) e VORA *et al.* (1999) a lipoxigenase é uma das enzimas mais comumente associadas a alterações de aroma em alimentos de origem vegetal, onde é responsável pela peroxidação enzimática de ácidos graxos insaturados, levando à formação de inúmeros aldeídos e cetonas, responsáveis por alterações bioquímicas de aromas naturais ocasionando a rancidez, perda de sabores e aromas desejáveis nos alimentos.

Em relação à textura observa-se que, de um modo geral, não houve uma redução importante do aspecto crocante da hortaliça em questão entre os tratamentos durante o período de análise.

Considerando os resultados como um todo, pode-se dizer que não foram observadas diferenças significativas entre a maioria dos grupos que permitam indicar um ou outro tratamento como o de melhor resultado quanto aos atributos sensoriais da alface americana minimamente processada, durante os dias analisados, tendo os tratamentos, de um modo geral, apresentado desempenho semelhante.

Os resultados da análise sensorial para a alface crespa minimamente processada podem ser verificados na *Tabela 13*.

Tabela 13: Média das notas sensoriais de alface crespa minimamente processada

Atributos	DIA 0					DIA 3					DIA 8				
	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)
Cor verde	ab 4,20	ab 5,19	a 3,19	ab 4,46	b 5,21	a 4,23	a 4,19	a 4,33	a 4,39	a 4,73	ab 4,83	a 4,23	a 4,20	ab 4,40	b 5,33
Cor amarela	a 1,30	a 1,13	a 1,81	a 2,26	a 1,77	a 2,23	a 2,01	a 1,57	a 2,33	a 1,53	a 1,80	a 2,00	a 2,20	a 1,90	a 1,60
Aroma	a 6,11	a 5,57	a 5,49	a 6,16	a 6,71	a 7,11	a 7,73	a 7,49	a 7,59	a 5,51	a 7,90	a 8,16	a 8,20	a 8,01	a 8,01
Textura (não oral)	a 6,17	a 6,91	a 6,23	a 7,03	a 7,13	ab 6,23	a 6,96	ab 6,13	ab 6,26	b 5,23	a 6,01	a 6,43	a 6,29	a 5,59	a 5,90

Obs: amostras indicadas por mesmas letras na mesma linha e no mesmo dia de análise não diferem significativamente ao nível de erro de 5%.

Em relação à cor verde, no dia zero os grupos tratados com ozônio a 0,5 e 1,5 mg.L⁻¹ apresentaram diferenças significativas entre si; já no dia 8 observa-se que os grupos tratados com cloro e ozônio a 1,5 mg.L⁻¹ apresentaram diferenças significativas entre si, como pode ser visualizado na *Tabela 13*. Analisando tal atributo como um todo, nota-se que, apesar da ocorrência pontual de algumas diferenças, os tratamentos exerceram pouca influência no atributo cor verde.

No atributo cor amarela não houve diferença significativa entre os grupos de alface crespa, tendo todos os grupos apresentado notas baixas para este atributo, tampouco no atributo aroma, entre os tratamentos dentro de um mesmo dia de análise, nos dias analisados.

No atributo textura não foram observadas diferenças significativas, exceto no dia 3, quando houve diferença significativa entre os grupos tratados com cloro e com ozônio a $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Pode-se dizer que a alface crespa não apresentou grande variação de suas características sensoriais entre os tratamentos sanitizantes. As notas atribuídas às diferentes amostras indicam um produto de boa manutenção de suas propriedades organolépticas até o final do armazenamento sob refrigeração, independente do tratamento empregado.

Os resultados da análise sensorial para o agrião minimamente processado podem ser verificados na *Tabela 14*.

Tabela 14: Média das notas sensoriais de agrião minimamente processado

Atributos	DIA 0					DIA 3					DIA 8				
	Controle	Cloro (100 mg.L^{-1} por 15min)	Ozônio ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Ozônio ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Ozônio ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Controle	Cloro (100 mg.L^{-1} por 15min)	Ozônio ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Ozônio ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Ozônio ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Controle	Cloro (100 mg.L^{-1} por 15min)	Ozônio ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Ozônio ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)	Ozônio ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1min)
Cor verde	a 6,13	a 6,13	a 5,36	a 6,23	a 6,06	a 6,91	a 6,91	a 4,87	a 6,36	a 4,60	a 6,36	a 6,47	cb 3,83	ab 5,80	ac 4,33
Cor amarela	a 1,31	a 1,23	a 2,00	a 0,70	a 0,61	a 1,51	a 1,71	b 6,13	a 2,91	c 6,20	a 1,20	a 0,91	b 6,83	a 2,71	b 5,93
Aroma	a 8,30	a 8,30	a 7,79	a 7,93	a 8,30	a 7,79	a 8,30	ab 5,59	b 3,40	a 8,30	ab 7,33	ab 6,66	b 8,30	ab 6,02	a 4,57
Textura (não oral)	a 7,27	a 6,93	a 6,91	a 6,91	a 6,59	a 6,20	a 6,20	a 5,43	a 6,03	a 5,90	a 5,03	a 5,67	b 2,46	ac 5,17	bc 3,29

Obs: amostras indicadas por mesmas letras na mesma linha e no mesmo dia de análise não diferem significativamente ao nível de erro de 5%.

Em relação à cor verde, não houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias 0 e 3. Verifica-se, no entanto, entre os grupos do dia 8 que aqueles tratados por ozônio a $0,5$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram notas menores em relação aos demais. Esta percepção sensorial coincide com o aumento da cor amarela, quando se analisa este outro atributo, nos mesmos tratamentos e

período considerados, como pode ser verificado na *Tabela 14*. Segundo WATADA *et al.* (1990) e VAROQUAUX & WILEY (1994) após a colheita, durante a senescência há o aumento de reações degradativas e a redução da atividade biossintética da planta, sendo a mesma caracterizada por diversas alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas do vegetal, entre elas o aumento na produção do etileno, que pode ativar enzimas relacionadas com o incremento da descoloração da cor verde em hortaliças folhosas, provavelmente devido ao aumento da atividade da clorofilase, com a degradação da clorofila e síntese de seus subprodutos como a feofitina e o feofórbio, alterando a intensidade desta cor.

No que diz respeito ao atributo aroma, no dia 0 de análise não foi verificada diferença significativa entre os grupos. No dia 3 o tratamento por ozônio a 1 mg.L^{-1} se mostrou significativamente diferente dos grupos controle e cloro, tendo apresentado notas inferiores em relação aos demais. No dia 8, os grupos tratados por ozônio obtiveram médias não significativamente diferentes em relação aos grupos controle e cloro, mantendo de um modo geral, notas elevadas para o atributo em questão.

Quanto à textura, não houve diferenças significativas entre os grupos nos dias 0 e 3. Verificam-se no dia 8, notas menores de todos os grupos, indicando uma perda geral da textura característica da hortaliça. Os resultados sugerem que há uma gradual alteração da textura decorrente dos processos fisiológicos degradativos naturais inerentes à fase de senescência do tecido vegetal.

Levando-se em conta os resultados como um todo, o agrião não apresentou alterações sensoriais marcantes que pudessem ser atribuídas a algum tratamento em específico, podendo se dizer que não foram observadas diferenças significativas entre a maioria dos grupos que permitam indicar um tratamento como o ideal.

Os resultados da análise sensorial para a rúcula minimamente processada podem ser verificados na *Tabela 15*.

Tabela 15: Média das notas sensoriais de rúcula minimamente processada.

Atributos	DIA 0					DIA 3					DIA 8				
	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Controle	Cloro (100mg.L ⁻¹ por 15min)	Ozônio (0,5mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,0mg. L ⁻¹ por 1min)	Ozônio (1,5mg. L ⁻¹ por 1min)
Cor verde	a 7,33	b 7,71	a 7,33	a 7,33	a 7,33	a 6,61	a 6,61	a 6,61	a 6,61	a 6,61	a 6,87	a 6,33	b 3,23	a 6,73	b 3,24
Cor amarela	a 0,00	a 0,00	a 0,00	a 0,00	a 0,20	a 0,50	a 0,36	a 0,53	a 0,50	a 0,86	a 1,41	a 3,00	a 3,43	a 2,09	a 5,81
Aroma	a 7,96	a 8,09	a 7,56	a 7,06	a 7,17	a 6,26	b 8,56	ab 8,29	ab 8,29	ab 8,29	a 5,86	a 6,01	a 5,16	a 7,33	a 4,23
Textura (não oral)	a 7,10	a 7,76	a 7,70	a 7,70	a 7,91	a 6,89	a 7,00	a 7,30	a 7,30	a 7,30	a 6,16	a 6,36	ac 5,41	ab 6,00	bc 4,59

Obs: amostras indicadas por mesmas letras na mesma linha e no mesmo dia de análise não diferem significativamente ao nível de erro de 5%.

A rúcula apresentou notas muito semelhantes entre os tratamentos para o atributo cor verde nos dias 0 e 3, embora o grupo tratado com cloro (dia 0) tenha apresentado diferença significativa em relação aos demais. No dia 8 foi verificada diferença significativa nos grupos tratados por ozônio a 0,5 e 1,5 mg.L⁻¹ em relação aos demais tratamentos, fato este caracterizado pela significativa percepção da coloração verde-claro em relação aos demais, apresentando notas menores, como pode ser observado na *Tabela 15*. Nos mesmos tratamentos e período, esta percepção mantém relação com o aumento das notas relativas à cor amarela, embora nesta mesma data (dia 8) não haja diferença significativa entre os tratamentos deste atributo. Etapas no processamento mínimo que levem a danos do tecido vegetal podem acarretar na degradação da clorofila em compostos indesejáveis como o feofórbio e a feofitina, resultando na perda da cor verde (HEATON & MARANGONI, 1996).

Em relação ao aroma, não houve variação significativa entre os diferentes tratamentos no dia 0. No dia 3, os tratamentos controle e com cloro apresentaram diferenças significativas entre si, havendo no dia 8 uma redução geral nas notas deste atributo. Tais resultados podem ser creditados às alterações fisiológicas que ocorrem nas hortaliças minimamente processadas, manifestando-se durante o tempo de armazenamento sob refrigeração, conforme já discutido anteriormente. Considerando-se as notas do atributo aroma como um todo, no entanto, não foi possível detectar a atuação marcante de nenhum dos tratamentos estudados na característica sensorial em questão.

Com relação à textura, nos dias 0 e 3 não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos empregados, exceto no dia 8, onde os tratamentos por cloro e ozônio $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram diferenças significativas entre si. Percebe-se, neste mesmo dia, uma diminuição da crocância em todos os tratamentos empregados. Alterações fisiológicas que afetam a textura do tecido ocorrem desde o período de maturação do vegetal e se estendem pelo período de pós-colheita. Em geral, a decomposição enzimática de celuloses, hemiceluloses e protopectinas provoca o afrouxamento da parede celular, acarretando na perda de firmeza dos vegetais, especialmente após o processamento mínimo (WILLS *et al.*, 1989).

Em relação à rúcula, pode-se dizer que não houve variações sensoriais marcadamente importantes que pudessem indicar a ação mais intensa de algum dos tratamentos. Verifica-se um aumento do amarelecimento da hortaliça no dia 8, entretanto, não há diferenças significativas entre os grupos, levando a entender que o processo é decorrente das reações de senescência intrínsecas no vegetal.

Analisando-se as hortaliças de modo geral, os diferentes tratamentos não exerceram influência marcante sobre seus atributos sensoriais, levando a sugerir que tanto o tratamento por cloro como por ozônio não possuíram atuação relevante sobre as características sensoriais das hortaliças estudadas quando comparadas às amostras não tratadas, sob as mesmas condições. A ação

oxidante do ozônio, neste estudo, não aparentou possuir influência relevante nos atributos sensoriais dos minimamente processados de um modo geral, com exceções pontuais já descritas anteriormente.

6. CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos por esta pesquisa podemos chegar às seguintes conclusões:

6.1. Em relação ao efeito dos enxágues na redução da população de contaminantes das hortaliças no geral

- Os enxágues com água possuem relevância na redução da contaminação geral das hortaliças reduzindo, em média, um ciclo logarítmico da população contaminante em todas as hortaliças estudadas.

6.2. Em relação ao efeito do uso do ozônio e cloro na redução de contaminação por coliformes totais

- Os tratamentos com ozônio mostraram-se, em média, semelhantes ou mais eficientes que o tratamento com cloro para a redução da população de coliformes totais das hortaliças, sendo que a eficiência é proporcional à concentração do gás no processo.
- Tendo em consideração a população média das hortaliças a ozonização é mais vantajosa quando comparada ao tratamento por cloro a partir da concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ por 1 minuto.

6.3. Em relação ao efeito do uso do ozônio e cloro na redução de contaminação por bolores e leveduras

- Ao contrário da sanitização por cloro, que demonstrou eficácia inexpressiva contra a população de bolores e leveduras, o ozônio agiu efetivamente na redução da contaminação.

- Ao final do período de análise, os grupos tratados por ozônio apresentaram uma população média de bolores e leveduras notadamente menor que os grupos tratados por cloro.

6.4. Em relação ao efeito do uso do ozônio e cloro na redução de contaminação por aeróbios psicrotróficos

- Os grupos submetidos aos tratamentos sanitizantes mantiveram, de um modo geral, as contagens dos microrganismos em questão em níveis baixos até o final do período de análise.
- Estudos mais detalhados sobre o comportamento destes microrganismos frente aos diferentes processos de sanitização são necessários.

6.5. Em relação à pesquisa de Salmonella sp.

- A não detecção de *Salmonella* sp. nas amostras pesquisadas sugere que condições favoráveis durante a produção e transporte podem ter colaborado para uma menor chance de acesso do agente ao produto, além da competição populacional com outros grupos de microrganismos presentes nas amostras, que também pode ter exercido influência no seu não isolamento neste trabalho.

6.6. Análise Sensorial

- Os tratamentos sanitizantes, de um modo geral, não apresentaram influência relevante nos atributos sensoriais das hortaliças estudadas.
- Os grupos tratados por ozônio apresentaram, em termos gerais, comportamento sensorial semelhante aos tratados por cloro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDUL-RAOUF, U. M.; BEUCHAT, L. R.; AMMAR, M. S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 7, p. 1999-2006, 1993.
2. ADAMS, M. R.; HARTLEY, A. D.; COX, L. J. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. **Food Microbiology**, London, v. 6, n. 2, p. 69-77, 1989.
3. AHVENAINEN, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 7, p. 180-187, 1996.
4. AMAHMID, O.; ASMAMA, S.; BOUHOUM, K. The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 19-26, 1999.
5. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4^a ed. Washington: APHA, 2001.
6. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20^a ed. Washington: APHA, 1998.
7. ANZALDÚA-MORALES, A. **La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica**. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1994.
8. BADER, H.; HOIGNÉ, J. Determination of ozone in water by the indigo method. **Water Research**, Oxford, n. 4, v. 15, p. 449-456, 1981.
9. BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O.; BAKER, R. A. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 35, n. 6, p. 509-524, 1995.
10. BALLESTEROS, F. R. Poscosecha del tomate para consumo en fresco. In: NÚEZ, F. **El Cultivo del Tomate**. Barcelona: Mundi-Prensa, 1995.
11. BARRIGA, M. I.; TRACHY, G.; WILLEMOT, C.; SIMARD, R. E. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 6, p. 1586-1589, 1991.
12. BART, M. M.; ZHOU, C.; MERCIER, J.; PAINE, F. A. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1286-1288, 1995.

13. BARTH, M. M.; ZHUANG, H. Packaging design affects antioxidant vitamin retention and quality of broccoli florets during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 141-150, 1996.
14. BAUR, S.; KLAIBER, R.; HAMMES, W. P.; CARLE, R. Sensory and microbiological quality of shredded package iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 45-55, 2004.
15. BELLAR, T. A.; LICHTENBERG, J. J.; KRONER, R. C. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water. **Journal of the American Water Works Association**, Atlanta, v. 66, n. 12, p. 703-706, 1974.
16. BENNIK, M. H. J.; PEPPELENBOS, H. W.; NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 9, p. 209-221, 1996.
17. BEUCHAT, L. R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 145-158, 1992.
18. BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 2, p. 204-216, 1996.
19. BEUCHAT, L. R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 8, p. 845-849, 1999.
20. BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging, temperature and time. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 3, p. 755-758, 1990.
21. BIASI, L. A.; LIMA, M. R.; GABARDO, N. P.; SCHMID, M. L.; MARTHAUS, P. S.; ZAMBON, F. R. A. Competição de cultivares de alface na região metropolitana de Curitiba. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 14-15, 1991.
22. BLEINROTH, E. W. Armazenamento de frutas e hortaliças: fundamentos teóricos da conservação pelo frio das frutas e hortaliças. **Boletim do Itai**, Campinas, v. 34, p. 35-53, 1973.
23. BOLIN, H. R.; HUXSOLL, C. C. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 1, p. 60-62, 67, 1991.

24. BONOME, L. T. S.; CARVALHO, R.; MALUF, W. R. Hortaliças - Processamento mínimo. **Boletim Técnico de Hortaliças**, Lavras, n. 36, 1999.
25. BOTT, T. R. Ozone as a disinfecting in a process plant. **Food Control**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 44-49, 1991.
26. BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n. 12, p. 999-1003, 1987.
27. BRACKETT, R. E. Microbiological safety of chilled foods current issues. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 81-85, 1992a.
28. BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 10, p. 808-814, 1992b.
29. BRACKETT, R. E. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**, p. 269-312. New York: Chapman and Hall, 1994.
30. BRACKETT, R. E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 305-311, 1999.
31. BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. **General Chemistry Principle and Structure**. New York: John Wiley and Sons, 1978.
32. BRECHT, J. K. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 18-22, 1995.
33. BROADWATER, W. T.; HOEHN, R. C.; KING, P. H. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. **Applied Microbiology**, Washington, v. 26, n. 3, p. 391-393, 1973.
34. BROCKLEHURST, T. F.; ZAMAN-WONG, C. M.; LUND, B. M. A note on the microbiology of retails packs of prepared salad vegetables. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 409-415, 1987.
35. BRUNGS, W. A. Effects of residual chlorine on aquatic life. **Journal of Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 45, n. 10, p. 2180-2193, 1973.
36. BRYAN, F. L. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, n. 1, p. 45-56, 1977.
37. BUCHANAN, R. L. Contamination of intact apples after immersion in aqueous environment containing *E.coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 5, p. 444-450, 1999.

38. BURNS, J. K. Lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 14, 1995.
39. CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R. Hortaliças prioritárias no planejamento da produção orientada: estacionalidade da produção e dos preços. **Informações Econômicas** – IEA, São Paulo, v. 24, n. 12, 1994.
40. CANTWELL, M. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. In: KADER, A. A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. 2ªed. Davis: University of California, p. 277-281, 1992.
41. CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C.; SILVA, A. A. Factors affecting the growth of *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh endive. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, n. 6, p. 636-646, 1995.
42. CASTELL, G. **Larousse da Dieta e Nutrição**. São Paulo: Larousse Brasil, 2004.
43. CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC. Epidemiologic notes and reports common – source outbreaks of giardiasis – New Mexico. **Morbidity & Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 38, n. 23, p. 405-407, 1989.
44. CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC. Foodborne outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* – Rhode Island and New Hampshire, 1993. **Morbidity & Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 43, n. 05, p.81, 87-88, 1994.
45. CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC. Multistate outbreaks of *Salmonella* serotype Poona infections associated with eating Cantaloupe from Mexico, United States and Canada, 2000-2002. **Morbidity & Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, n. 46, p. 1044-1047, 2002.
46. CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE CAMPINAS S. A. **Padronização – Alface**. Disponível em: <http://www.ceasacampinas.com.br/padronizacao_alface.htm>. Acessado em: 30 ago., 2006.
47. CHAPMAN, P. A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O 157 infections. **British Food Journal**, Yorkshire, v. 97, n. 10, p. 29-31, 1995.
48. CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças – Fisiologia e Manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 1990. 320p.
49. CHITARRA, M. I. F. **Processamento mínimo de frutos e hortaliças**. Viçosa: UFV, 1998, 88p.

50. CHRISTÓVAO, D. A. **Contaminação da alface (*Lactuca sativa* L.) por microrganismos de origem fecal: estudo de métodos bacteriológicos para a sua determinação, medida da sua intensidade na cidade de São Paulo e eficiência de alguns tratamentos na sua redução.** São Paulo, 1958. Tese (Catedrático da Cadeira de Microbiologia) – Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1958.
51. COLLINS, H. F.; DEANER, D. G. Sewage chlorination versus toxicity – a dilemma? **Journal of Environmental Engineering**, Ottawa, v. 99, p. 761-772, 1973.
52. CORBO, M. R.; DEL NOBILE, M. A.; SINIGAGLIA, M. A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 69-73, 2006.
53. CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, v. 1 e 5, pp. 37-39, 56-58, 480. Rio de Janeiro, **IBDF - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, 1984.
54. CURSONS, R. T. M.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A. Effect of disinfectants on pathogenic free-living *Amoebae*: in axenic conditions. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 62-66, 1980.
55. DAREZZO, H. M.; ROCHA, E. S.; BENEDETTI, B. C.; GOMES, C. A. O. Avaliação do grau de redução da microbiota presente em alface americana (*Lactuca sativa* L.) em linha de processamento industrial. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2., 2000, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2000. p. 26.
56. DAVE, S.; KIM, J. G.; LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Kinetics of inactivation of *Salmonella enteritidis* by ozone. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS ANNUAL MEETING. **Book of Abstracts...** Atlanta: IFT, 1998, p. 15.
57. DAVIS, H.; TAYLOR, J. P.; PERDUE, J. N.; STELMA JR, G. N.; HUMPHREYS JR, J. M.; ROWNTREE, R. III.; GREENE, K. D. A shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 128, n. 6, p. 1312-1321, 1988.
58. DE ROEVER, C. Microbiology safety evaluations and recommendations on fresh produce. **Food Control**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 321-347, 1998.
59. DEL-ROSARIO, B. A.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Cantaloupe and watermelon. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 1, p. 105-107. jan, 1995.
60. DEWALL, C. S.; ALDERTON, L.; JACOBSON, M. F. **Outbreak alert! Closing the gaps in our federal food-safety net.** Center for Science in the Public Interest: Washington DC, 2000. Disponível em: <<http://www.cspinet.org/reports/index.html>>. Acesso em: 03 ago. 2006.

61. DORANTES-ALVAREZ, L.; CHIRALT, A. Colour of minimally processed fruits and vegetables as affected by some chemical and biochemical changes. In: ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M. S.; LÓPEZ-MALO, A. **Minimally Processed Fruits and Vegetables**. Gaithersburg: Aspen, 2000. p. 111-126.
62. DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A. K. Effectiveness of ozone, heat, chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 19-24, 2005.
63. ERCOLANI, G. L. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, n. 6, p. 847-852, 1976.
64. ESTADO DE SÃO PAULO. Portaria CVS-6/99, de 10 de março de 1999. Aprova o Regulamento Técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **Diário Oficial do Estado [de São Paulo]**. São Paulo, SP, 12 de março de 1999, seção 1, p. 24-27.
65. EWELL, A. W. Present use and future prospects of ozone in food storage. **Food Research**, San Diego, v. 33, p.101-108, 1938.
66. FAIN, A. R. A review of the microbiological safety of fresh salads. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 16, n. 3, p. 146-149, 1996.
67. FARBER, J. M.; WANG, S. L.; CAI, Y.; ZHANG, S. Changes in population of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 2, p. 192-195, 1998.
68. FAROOQ, S.; AKHLAQUE, S. Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation. **Water Resource**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 809-812, 1983.
69. FENNEMA, O. Loss of vitamins in fresh and frozen foods. **Food Technology**, Chicago, v. 31, n. 12, 1977.
70. FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. São Paulo: EPU, 1985. v. 2. 401 p.
71. FETT, W. F. Factors affecting the efficacy of chlorine against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on alfafa seed. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 2-3, p. 135-149, 2002.
72. FLEET, G. Spoilage yeasts. **Critical Reviews on Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, n. 1-2, p. 1-44, 1992.

73. FORNI, L.; BAHNEMANN, D.; HART, E. J. Mechanism of the hydroxide ion initiated decomposition of ozone in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 86, n. 2, p. 255-259, 1982.
74. FRANCIS, G. A.; O'BEIRNE, D. Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *L. innocua* and *L. monocytogenes* on minimally processed lettuce. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 141-151, 1997.
75. FRANCIS, G. A.; O'BEIRNE, D. Effects of vegetable type and antimicrobial dipping on survival and growth of *Listeria innocua* and *E. coli*. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 711-718, 2002.
76. FRANCIS, G. A.; THOMAS, C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 1-22, 1999.
77. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004. 182 p.
78. FREIRE JR., M.; DELIZA, R.; CHITARRA, A. B. Alterações sensoriais em alface hidropônica cv. Regina minimamente processada e armazenada sob refrigeração. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v. 20, n. 1, p. 63-66, 2002.
79. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE **Censo Agropecuário**. Rio de Janeiro, 1989. <Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=1&i=P&e=l&c=419>> Acesso em: 03 Ago. 2006.
80. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE **Censo Agropecuário: Sudeste**. Rio de Janeiro, 1996. <Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/download/f5756.csv>> Acesso em: 03 Ago. 2006.
81. GAGLIARDI, J. V.; KARNS, J. S. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 827-833, 2000.
82. GARG, N.; CHUREY, J. J.; SPLITTSTOESSER, D. F. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 8, p. 701-703, 1990.
83. GELDREICH, E. E.; BORDNER, R. H. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market: A review. **Journal of Milk and Food Technology**, Des Moines, v. 34, n. 4, p. 184-195, 1971.

84. GELLI, D. S.; TACHIBANA, T.; OLIVEIRA, I. R.; ZAMBONI, C. Q.; PACHECO, J. A.; SPITERI, N. Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 39, p. 37-43, 1979.
85. GLASER, L.; LUCIER, G.; THOMPSON, G. Lettuce: In & Out of the Bag. **Agricultural Outlook**, Washington – DC, n. 280, p. 10-13, April, 2001. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/publications/AgOutlook/April2001/AO280d.pdf>. Acessado em: 30 Ago. 2006.
86. GOULARTE, L.; MARTINS, C. G.; MORALES – AIZPURÚA, I. C.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; VIZEU, D. M.; HUTZLER, B. W.; LANDGRAF, M. Combination of minimal processing and irradiation to improve the microbiological safety of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 1-2, p. 155-159, 2004.
87. GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.
88. GREEN, S. K.; SCHROTH, M. N.; CHO, J. J.; KOMINOS, S. D.; VITANZA-JACK, V. B. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 28, n. 6, p. 987-991, 1974.
89. GREENBERG, A. E. Public health aspects of alternative water disinfectants. **Journal of the American Water Works Association**, Atlanta, v. 73, n. 1, p. 31-33, 1981.
90. GREENE, A. K.; FEW, B. K.; SERAFINI, J. C. A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 11, p. 3617-3620, 1993.
91. GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiological Review**, Oxford, n. 1, v. 13, p. 60-98, 1991.
92. GUILHERME, A. L. F.; ARAÚJO, S. M.; FALAVIGNA, D. L. M.; PUPULIN, A. R. T.; DIAS, M. L. G. G.; OLIVEIRA, H. S. de; MAROCO, E.; FUKUSHIGUE, Y. Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, 1999.
93. GUTIERREZ, E. Japan prepares as O157 strikes again. **Lancet**, London, v. 349, n. 9059, p. 1156, 1997.
94. GUZEL-SEYDİM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDİM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**, San Diego, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

95. GUZEL-SEYDIM, Z. B.; WYFFELS, J. T.; GREENE, A. K.; BODINE, A. B. Removal of dairy soil from heated stainless steel surfaces: Use of ozonated water as a prerinse. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 8, p. 1887-1891, 2000.
96. HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 7, p. 8-15, 1996.
97. HIGGINS, K. T. Out with the old and in with new nonthermal processing technologies for the food and beverage industry. **Food Engineering** (on line). Issue 01/06/2001. Disponível em: <http://www.foodengineering.org/fe/cda/articleinformation/coverstory/bnpcoverstoryitem/0,95014,00+en-uss_01dbc.html>. Acesso em: 15 ago., 2006.
98. HILDEBRAND, D. F. Lipoxygenases. *Physiologia Plantarum*, v. 76, n. 2, p. 249-253, 1989.
99. HILL, A. G.; RICE, R. G. Historical background properties and applications. In: RICE, R. G.; NETZER, A. **Handbook of Ozone Technology and Applications**. Ann Arbor: Ann Arbor Science, 1982, p.1-37.
100. HOBBS, G. Ecology of food microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 12, n. 1, p. 15-30, 1986.
101. HOIGNÉ, J.; BADER, H. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. **Water Research**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 377-386, 1976.
102. HOOVER, D. G. Minimally processed fruits and vegetables: reducing microbial load by nonthermal physical treatments. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 66-71, 1997.
103. HORVATH, M.; BILITZKY, L.; HUTTNER, J. Fields of utilization of ozone. In: CLARK, R. J. H. **Ozone**. New York: Elsevier Science, 1985, p. 257-316.
104. HUXSOLL, C. C.; BOLIN, H. R. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 2, p. 124-128, 1989.
105. IBANOGLU, S. Wheat washing with ozonated water: effects on selected flour properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, p. 579-584, 2002.

106. INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX – IPNI. **Plant Name Details: Astaraceae *Lactuca sativa* L.** Kew: The Royal Bothanic Gardens. Disponível em: < http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=228239-1&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3Dlactuca%2Bsativa%26output_format%3Dnormal>. Acessado em: 11 dez., 2006.
107. INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX – IPNI. **Plant Name Details: Brassicaceae *Eruca sativa* Mill.** Kew: The Royal Bothanic Gardens. Disponível em: <http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=283412-1&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3Deruca%2Bsativa%26output_format%3Dnormal> Acessado em: 30 ago., 2006.
108. INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX – IPNI. **Plant Name Details: Brassicaceae *Nasturtium officinale* R. Br.** Kew: The Royal Bothanic Gardens. Disponível em <http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=167338-2&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3Dnasturtium%2Bofficinale%26output_format%3Dnormal>. Acessado em: 30 ago., 2006.
109. ITOH, Y.; SUGITA - KONISHI, Y.; KASUGA, F.; IWAKI, M.; HARA - KUDO, Y.; SAITO, N.; NOGUUCHI, Y.; KONUMA, H.; KUMAGAI, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1532-1535, 1998.
110. JARROL, E. L.; BINGHAM, A. K.; MEYER, E. A. Effect of chlorine on giardia lamblia cyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 483-487, 1981.
111. JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
112. **JORNAL DO BRASIL**, Rio de Janeiro, 21 jun. 1997. 1º caderno, p. 17.
113. JUNQUEIRA, A. H.; LUENGO, R. F. A. Mercados diferenciados de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 95-99, 2000.
114. KADER, A. A. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 99-104, 1986.
115. KAWAMURA, K.; KANEKO, M.; HIRATA, T; TAGUCHI, K. Microbial indicators for the efficiency of disinfection process. **Water Science Technology**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 175-184, 1986.
116. KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J-G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

117. KHAN, M. R.; SAHA, M. L.; KIBRIA, H. M. G. A bacteriological profile of salad vegetables in Bangladesh with special reference to coliforms. **Letters and Applied Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 88, 1992.
118. KIM, M. J.; OH, Y. A.; KIM, M. H.; KIM, M. K.; KIM, S. D. Fermentation of Chinese cabbage kimchi inoculated with *Lactobacillus acidophilus* and containing ozone-treated ingredients. **Journal of Korean Society of Food Nutrition**, New York, v. 22, p. 165-174, 1993.
119. 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.
120. KIM, J.-G.; YOUSEF, A. E.; KHADRE, M. A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 45, p. 167-218, 2003.
121. KING JR, A. D.; BOLIN, H. R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 2, p.132-135, 1989.
122. KING JR, A. D.; MAGNUSON, J. A.; TÖRÖK, T.; GOODMAN, N. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 2 , p. 459-461, 1991.
123. KIRK, J. R.; MITCHELL, S. K. Risks and benefits associated with chlorine in the food industry. In: JOLLEY, R. L. **Water Chlorination: Environmental Impact Health Efforts**. Ann Arbor: Ann Arbor Science, v. 3, 1980, p. 283-303.
124. KLEIN, B. P. Nutritional consequences of minimal processing of fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 179-193, 1987.
125. KLEIN, B. P.; PERRY, A. K. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, n. 3, p. 941-945, 1982.
126. KOMINOS, S. D.; COPELAND, C. E.; GROSIAK, B.; POSTIC, B. Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. **Applied Microbiology**, Washington, v. 24, p. 567-570, 1972.
127. KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C. R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1423-1428, 1990.
128. KRASNER, S. W.; MCGUIRE, M. J.; JACANGELO, J. G.; PATANIA, N. L.; REAGAN, K. M.; AIETA, E. M. The occurrence of disinfection by-products in US drinking water. **Journal of the American Water Works Association**, Atlanta, v. 81, n. 8, p. 41-53, 1989.

129. LANDGRAF, M. Deterioração microbiana de alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 93-107.
130. LEITÃO, M. F. F. **Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no Estado de São Paulo**. 1979. 148 p. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.
131. LIANGJI, X. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n.10, p. 58-61, 1999.
132. LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; BARBERY, S. D. F.; GARCÍA, N. H. P.; BRITO, E. S.; LIMA, C. A. A. Obtenção e utilização da enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura no melhoramento do sabor do cacau (*Theobroma cacao* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, 2001.
133. LIN, C-M.; FERNANDO, S. Y.; WEI, C-I. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetable salads. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 135-140, 1996.
134. LINDQVIST, K. On the origin of cultivated lettuce. **Hereditas**, Lund, v. 46, p. 319-350, 1960.
135. LIPTON, W. J.; RYDER, E. J. Lettuce. In: ESKIN, N. A. M. **Quality and preservation of vegetables**, p. 217-244. Boca Raton: CRC Press, 1989.
136. LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Estado actual de los productos mínimamente procesados en España. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4., 2006, Piracicaba. **Palestras...** Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 77-80.
137. LUND, D. Design of thermal processes for maximizing nutrient retention. **Food Technology**, Chicago, v. 31, n. 2, p. 71-78, 1977
138. MACGLYNN, W. **Guidelines for the Use of Chlorine Bleach as a Sanitizer in Food Processing Operations**: FAPC – 116. Stillwater: Oklahoma State University, 2004.
139. MARRIOT, N. G. **Principles of food sanitation**. 3 ed., New York: Chapman & Hall, 1994.

140. MARTÍN-DIANA, A. B.; RICO, D.; BARRY-RYAN, C.; FRÍAS, J. M.; MULCAHY, J.; HENEHAN, G. T. M. Comparison of calcium lactate with chlorine as a washing treatment for fresh-cut lettuce and carrots: quality and nutritional parameters. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 85, n. 13, p. 2260-2268, 2005.
141. MARTINS, C. G.; FRODER, H.; SOUZA, K. L. O. Ecologia microbiana de vegetais folhosos minimamente processados. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. p.154.
142. MARTINS, M. M.; EMPIS, J. **Produtos Horta Frutícolas Frescos ou Minimamente processados.** Processamentos Mínimos. Lisboa: Principia, 2000.
143. MATHEW, A. G.; PARPIA, H. A. B. Food browning as a polyphenoloxidase reaction. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 75-145, 1971.
144. MATTHEWS, R. F.; CRILL, P.; LOCASCIO, S. J. β -carotene and ascorbic acid content of tomatoes as affected by maturity. **Proceedings of The Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v. 87, p. 214-216, 1974.
145. MCKENZIE, K. S.; SARR, A. B.; MAYURA, K.; BAILEY, R. H.; MILLER, D. R.; PHILLIPS, T. D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, p. 807-820, 1997.
146. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques.** 3ed. Boca Raton: CRC Press, 1999.
147. MELLO, J. C.; DIETRICH, R.; MEINERT, E. M.; TEIXEIRA, E.; AMANTE, E. R. Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida-de-prateleira de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 418-426, 2003.
148. MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 110-115, 2006.
149. MESQUITA, V. C. L.; SERRA, C. M. B.; BASTOS, O. M. P.; UCHÔA, C. M. A. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, 1999.
150. MINEAR, R. A.; AMY, G. L. **Disinfection by-products in water treatment: The chemistry of their formation and control.** Boca Raton: CRC Press, 1995.
151. MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. A importância dos pré-processados. **Fruitsfatos**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 16-18, 1999.

152. MONTEIRO, C. L. B. **Técnicas de Avaliação Sensorial**. Curitiba: UFPA - Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos, 1984.
153. MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. Campinas: UNICAMP, 5 ed., 1993. 85 p.
154. MORETTI, C. L.; MACHADO, C. M. M. Aproveitamento de resíduos sólidos do processamento mínimo de frutas e hortaliças. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4, 2006, Piracicaba. **Palestras...** Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 25-32.
155. MORETTI, C. L.; PUSCHMANN, R. Processamento mínimo de hortaliças. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4, 2006, Piracicaba. **Palestras...** Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 234-239.
156. MORRIS, S.; JOBLING, J. **Watercress**. Sydney: Sydney Postharvest Laboratory – Food Science Australia, 2004. 2p.
157. MÜLLER, G. **Microbiologia de los alimentos vegetais**. Zaragoza - Acribia, 1981. 291 p.
158. NEFF, J. New disinfectant from out of the blue. **Food Processing**, Itasca, v. 59, n. 5, p. 135-137, 1998.
159. NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, p. 371-401, 1994.
160. NGUYEN-THE, C.; PRUNIER, J. P. Envolvement of pseudomonas in the deterioration of 'ready-to-use' salads. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 47-58, 1989.
161. O'DONOVAN, D. C. Treatment with ozone. **Journal of the American Water Works Association**, Atlanta, v. 57, n. 9, p. 1167-1192, 1965.
162. ODUMERU, J. A.; MITCHELL, S. J.; ALVES, D. M.; LYNCH, J. A.; YEE, J. A.; WANG, A. J.; STYHADIS, S. L.; FARBER, J. M. Microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 8, p. 954-960, 1997.
163. OGAWA, J. M.; FELICIANO, A. J.; MANJI, B. T. Evaluation of ozone as a disinfectant in postharvest dump tank treatments for tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 1020, 1990.
164. ONG, K. C.; CASH, J. N.; ZABIK, M. J.; SIDDIQ, M.; JONES, A. L. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. **Food Chemistry**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 152-160, 1996.

165. PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba – SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 50-55, 2002.
166. PAGE, T.; HARRIS, R. H.; EPSTEIN, S. S. Drinking water and cancer mortality in Louisiana. **Science**, Washington, v. 193, n. 4247, p. 55-57, 1976.
167. PAULA, P.; RODRIGUES, P. S. S.; TÓRTORA, J. C. O.; UCHÔA, C. M. A.; FARAGE, S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 4, p. 535-537, 2003.
168. PEETERS, J. E.; MAZAS, E. A.; MASSCHELEIN, W. J.; MARTINEZ DE MATURANA, I. V.; DEBACKER, E. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 6, p. 1519-152, 1989.
169. PERKINS, M. **Ozone in food processing applications – Past experience, future potential and regulatory issues**. Iowa: Zentox Corporation, 1997. Disponível em: <http://www.ozoneapplications.com/food_processing/Ozofood.pdf>. Acesso em: 03 ago., 2006.
170. PHILLIPS, C. A. Review: Modified atmosphere packing and its effects on the microbiological quality and safety of produce. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 463-479, 1996.
171. PILON, L. **Estabelecimento da vida útil de hortaliças minimamente processadas sob atmosfera modificada e refrigeração**. Tese para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.
172. PINHEIRO, N. M. S.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, 2005.
173. PONKÄ, A.; ANDERSSON, Y.; SIITONEN, A.; de JONG, B.; JAHKOLA, M.; HAIKALA, O.; KUHMENEN, A.; PAKKALA, P. *Salmonella* in alfalfa sprouts. **Lancet**, London, v. 345, n. 8947, p. 462-463, 1995.
174. PORTO, E.; EIROA, M. N. U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, London, v. 21, n. 4, p. 282-286, 2001.

175. PRIEPKE, P. E.; WEI, L. S.; NELSON, A. L. Refrigerated storage of prepackaged salad vegetables. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 379-385, 1976.
176. PRYOR, A. Ozone toxicology and guidelines for safe use in food processing ozonation systems. In: Ozone III: AGRICULTURAL & FOOD PROCESSING APPLICATIONS OF OZONE AS AN ANTIMICROBIAL AGENT. **Abstracts...** Fresno: California Agricultural Technology Institute, 2002.
177. PUSCHMANN, R.; COSTA, F. B.; SIMÕES, A. N.; SILVA, E. O. História e atualidades sobre pesquisa com processamento mínimo de frutas e hortaliças no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4, 2006, Piracicaba. **Palestras...** Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 4-15.
178. QIANG, Z.; DEMIRKOL, O.; ERCAL, N.; ADAMS, C. Impact of food disinfection on beneficial biothiol contents in vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 25, p. 9830-9840, 2005.
179. RABELLO, T. Processamento mínimo, lucro máximo. **Revista Frutas & Legumes**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 13-20, 1999.
180. RAGAERTA, P.; VERBEKEB, W.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVEREA, J. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. **Food Quality and Preference**, Essex, v. 15, n. 3, p. 259-270, 2004.
181. RESTAINO, L.; FRAMPTON, E. W.; HEMPHILL, J. B.; PALNIKAR, P. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 9, p. 3471-3475, 1995.
182. RICE, R. G.; FARQWHAR, J. W.; BOLLYKY, L. J. Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. **Ozone Science Engineering**, Boca Raton, v. 4, n. 3, p. 147-163, 1982.
183. RICE, R. G.; ROBSON, C. M.; MILLER, G. W.; HILL, S. G. Use of ozone in drink water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, Atlanta, v. 73, n. 1, p. 44-57, 1981.
184. RICHARDSON, S. D.; THRUSTON, A.; CAUGHRAN, T.; COLLETTE, T.; PATTERSON, K.; LYKINS, B. Chemical by-products of chlorine and alternative disinfectants. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 4, p. 58-61, 1998.
185. RIVA, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, A. Microbiological quality and shelf life modeling of ready-to-eat cicorino. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 2, p. 228-234, 2001.

186. RODGERS, S. L.; CASH, J. N.; SIDDIQ, M.; RYSER, E. T. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 4, p. 721-731, 2004.
187. RODRIGUES, D. **Especialistas discutem mercado de alimentos minimamente processados**. Embrapa, 2004. Disponível em: <www.embrapa.br:8080/aplic/bn.nsf/0/c5a85a87fae14b3083256a530067c4e1?OpenDocument> . Acesso em: 15 ago., 2006.
188. RODRIGUES, G.; ALVES, M. A. B. F.; MALUF, W. R. Hortaliças minimamente processadas. **Boletim Técnico de Hortaliças**, Lavras, n. 31, 1999.
189. ROVERSI, R. M.; MASSON, M. L. Qualidade da alface crespa minimamente processada acondicionada em atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, 2004.
190. RUIZ, B. G.-V.; VARGAS, R. G.; GARCIA-VILLANOVA, R. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 4, p. 285-291, 1987.
191. RYDER, E. J. **Breeding vegetable crops**. Gainesville: Vegetable Crops Department, 1982. 736p.
192. SADDIK, M. F.; EL-SHERBEENY, M. R.; BRYAN, F. L. Microbiological profiles of Egyptian raw vegetables and salads. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 48, p. 883, 1985.
193. SALTVEIT, M. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, p. 279–292, 1999.
194. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. S. Especificações para embalagens dos vegetais minimamente processados (fresh-cut). **Boletim Técnico do Centro Tecnológico de Embalagens – CETEA – ITAL**, Campinas, v. 9, n. 5, p. 8, 1997.
195. SARIG, P.; ZAHAVI, T.; ZUTKHI, Y.; YANNAI, S.; LISKER, N.; BEN-ARIE, R. Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, n. 6, p. 403-415, 1996.
196. SARZI, B.; DURIGAN, J. F. Avaliação física e química de produtos minimamente processados de abacaxi-pérola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 333-337, 2002.

197. SECRETARIA DE AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO – Coordenadoria de Desenvolvimento dos Agronegócios CODEAGRO. **Programa Horti & Fruti Padrão – Alface**. Disponível em: <<http://www.codeagro.sp.gov.br/hortifruti/alface/>>. Acessado em: 03 ago., 2006.
198. SENESI, E. L'innovazione tecnologica dei prodotti minimamente trattati. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 12, p. 1212-1216, 1993.
199. SENTER, S. D.; BAILEY, J. S.; COX, N. A. Aerobic microflora commercially harvested, transported and cryogenically processed collards (*Brassica oleracea*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 4, p. 1021, 1987.
200. SEYMOUR, I. J.; APPLETON, H. Foodborne viruses and fresh produce. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 35, p. 759-773, 2001.
201. SHELDON, B. W.; BROWN, A. L. Efficacy of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chill water. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 305-309, 1986.
202. SHEWFELT, R. L. Postharvest treatment for extending the shelf life of fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 70-80, 1986.
203. SHEWFELT, R. L. Quality of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 10, n. 3, p. 143-156, 1987.
204. SHOOTER, R. A.; COOKE, E. M.; FAIERS, M. C.; BREADEN, A. L.; O'FARREL, S. M. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* spp. from food in hospitals, canteens and schools. **Lancet**, London, n. 7721, v. 2, p. 390-392, 1971.
205. SILVA, C. G. M. da; SAMARA, A. C. A.; STAMFORD, T. L. M. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10 (supl.), p. 63-69, 2005.
206. SILVA, E. O.; PUSCHMANN, R.; SOARES, N. F. F.; CARNELOSSI, M. A. G.; MORETTI, C. L.; CENCI, S. A. Procesamento mínimo de hortalizas no Brasil. **Simposium “Estado actual del mercado de frutos y vegetales cortados en Iberoamérica”**. San José, Costa Rica, 2004.
207. SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, R. L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 35, n. 8, p. 720-729, 2002.
208. SKOG, L. J.; CHU, C. L. Effect of ozone on quantities of fruits and vegetables in cold storage. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 81, n. 4, p. 773-778, 2001.

209. SKURA, B. J.; POWRIE, W. D. Modified atmosphere packing of fruits and vegetables. **Vegetable Processing**, New York: VCH Publishers, 1995, 279 p.
210. SOPHER, C. D.; GRAHAM, D. M.; RICE, R. G.; STRASSER, J. H. Studies on the use of ozone in production agriculture and food processing. In: INTERNATIONAL OZONE ASSOCIATION, **Proceedings of the International Ozone Association**. Chicago: American College of Healthcare Executives, 2002.
211. SORIANO, J. M.; RICO, H.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 123-128, 2000.
212. STEINBRUEGGE, E. G.; MAXCY, R. B.; LIEWEN, M. B. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready-to-serve lettuce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 51, n. 8, p. 596-599, 1988.
213. STEWART, D. S.; REINEKE, K. F.; ULASZEK, J. M.; TORTORELLO, M. L. Growth of *Salmonella* during sprouting of alfafa seeds associated with salmonellosis outbreaks. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 5, p. 618-622, 2001.
214. STOCKINGER, H. E. Ozone Toxicology: A review of research and industrial experience 1954-1964. **Archives of Environmental Health**, Washington, v. 10, n. 5, p. 719-731, 1965.
215. STURION, G. L.; SPOTO, M. H. F. Boas práticas de fabricação em indústrias de processamento mínimo de hortaliças e frutas. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4, 2006, Piracicaba. **Palestras...** Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 227-233.
216. SUSLOW, T. **Postharvest chlorination – Basic properties and key points for effective disinfection**. Davis: University of California – Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 2003, 1997. 8p.
217. TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. H. P.; BERGAMINI, A. M.; OKINO, M. H. T.; CASTRO E SILVA, A. A. M. C.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 2, p. 169-174, 2000.
218. TAKAYANAGUI, O. M.; OLIVEIRA, C. D.; BERGAMINI, A. M. M.; CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H. T.; FEBRÔNIO, L. H. P.; 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. 1, 2001.

219. TAUXE, R.; HEDBERG, C.; POTTER, M.; MADDEN, J.; WACHSMUCH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce. A preliminary report to the National Advisory Committee on microbiologic criteria for foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 11, p. 1400-1408, 1997.
220. THAYER, D. W.; RAJKOWSKI, K. T. Development in irradiation of fresh fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 53, p. 62-65, 1999.
221. TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 71-77, 2005.
222. TRANI, P. E.; TIVELLI, S. W.; PURQUERIO, L. F. V.; AZEVEDO FILHO, J. A. Hortaliças – Alface (*Lactuca sativa* L.). In: INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS – IAC, **Boletim 200**. Campinas: IAC, 2005.
223. TRUSSELL, R. R.; UMPHRES, M. D. The formation of trihalomethanes. **Journal of the American Water Works Association**, Atlanta, v. 70, p. 604-612, 1978.
224. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Germplasm Research Information Network. **Taxon: *Lactuca sativa* L.** Washington: USDA, 2006. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?21360>>. Acessado em: 11 nov., 2006.
225. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. Washington: USDA, 2004. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR17/sr17_doc.pdf> Acessado em: 11 nov., 2006.
226. U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Food Safety for You!**, sept. 2001a. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fttfruit.html>>. Acessado em: 11 nov., 2006.
227. U. S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 173. **Federal Register**, Washington, v. 66, n. 123, p. 33829-33830, jun. 2001b.
228. U. S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 184. **Federal Register**, Washington, v. 47, nov., 1982.
229. VAROQUAUX, P. Overview of the fresh-cut process in France. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4, 2006, Piracicaba. **Palestras...** Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 72-76.

-
230. VAROQUAUX, P.; MAZOLLIER, J. Overview of the European fresh-cut produce industry. In: LAMIKANRA, O. **Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market**. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 21-43.
231. VAROQUAUX, P.; WILEY, R. C. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York: Chapman and Hall, 1994, p. 226-228.
232. VICTORIN, K. Review of genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 227, n. 3, p. 221-238, 1992.
233. WALDROUP, A. L.; HIERHOLZER, R. E.; FORSUTHE, R. H.; MILLER, M. J. Recycling of poultry chill water using ozone. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 2, p. 330-336, 1993.
234. WASHINGTON STATE DEPARTMENT OF ECOLOGY, 2006. **Shoreline Plants – *Nasturtium officinale***. Minneapolis, 2006. Disponível em: <http://www.ecy.wa.gov/programs/wq/plants/plantid2/shoreline_index.html> Acessado em: 30 ago. 2006.
235. WATADA, A. Effects of ethylene on the quality of fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 82-85, 1986.
236. WATADA, A. E.; KAZUHIRO, A.; YAMUCHI, N. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 5, p. 116-122, 1990.
237. WEI, C-I.; COOK, D. L.; KIRK, J. R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technology**, Chicago, v. 39, p. 107-115, 1985.
238. WEI, C-I.; HUANG, T. S.; KIM, J. M. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfection with chlorinated water. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 829-836, 1995.
239. WEISSINGER, W. R.; CHANTARAPANONT, W.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of *Salmonella baidon* in shredded lettuce and diced tomatoes and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, p. 123-131, 2000.
240. WHITAKER, T. W. Lettuce: evolution of weedy cinderella. **HortScience**, St. Joseph, v. 9, p. 512-514, 1974.
241. WICKRAMANAYAKE, G. B.; RUBIN, A. G.; SPROUL, O. G. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts with ozone. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 671-672, 1984.

242. WILEY, R. C. Introduction to minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**, New York: Chapman and Hall, 1994, p. 1-14.
243. WILLS, R. H. H.; LEE, T. H.; McGLASSON, W. D.; GRAHAM, D.; HALL, E. G. **Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables**. 3 ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1989. 176p.
244. WINDHOLZ, M. **The Merck Index**. 10 ed., Rahway: Merck & Co., 1983.
245. WOJTOWICZ, J. A. Ozone. In: KIRK, R. E.; OTHMER, D. E. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 4 ed. New York: Wiley Interscience, 1996, p. 953-994.
246. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Partners of parasite control – teacher's guide**. Disponível em: <www.who.int/entity/wormcontrol/education_materials/lao/en/teacher_eng.pdf> Acessado em: 21 Nov 2006.
247. WU, F. M.; DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; WELLS, J. G.; MINTZ, E. D.; SWAMINATHAN, B. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 568-572, 2000.
248. XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 10, p. 58-61, 1999.
249. YAMAZAKI, T.; INOUE, M.; OGAWA, M.; SHIGA, S.; KISHIMOTO, T.; HAGIWARA, T.; MATSUMOTO, T.; HAYASHI, T. Inactivation of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* by ozone. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 406, 2004.
250. YILDIZ, E. Initial preparation, handling and distribution of minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables**. New York: Chapman & Hall, 1994, p. 15-65.
251. ZHANG, L.; ZHAOXIN, L.; ZHIFANG, Y.; XIANG, G. Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water. **Food Control**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 279-283, 2005.
252. ZHAO, J.; CRANSTON, P. M. Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. **Journal of Science Food and Agriculture**, Chichester, v. 68, n. 1, p. 11-18, 1995.
253. ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; BESSER, R. E. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O 157:H7 in apple cider with and without preservatives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 8, p. 2526-2530, 1993.

ANEXO

Figura 20. Equipamento ozonizador: A) vista do painel de controle; B) vista lateral; C) vista posterior com câmara de ozonização; D) vista interna da câmara de ozonização.



A)



B)



C)

Figura 21. Processamento mínimo: A) vista da área de processamento com tanque de 1º enxágüe (ao fundo) e bandeja de 2º enxágüe (à frente); B) vista da área de processamento C) vista do equipamento refrigerador com amostras processadas já embaladas.