

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E
CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA OZONIZADA PARA
SANITIZAÇÃO DE ALFACE**

EVELINE KÁSSIA BRAGA SOARES

CAMPINAS
MAIO DE 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E
CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA OZONIZADA PARA
SANITIZAÇÃO DE ALFACE**

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

EVELINE KÁSSIA BRAGA SOARES

Orientador: Prof. Dr. ARMANDO KAZUO FUJII
Co-Orientador: Prof. Dr. SYLVIO LUIS HONÓRIO

CAMPINAS
MAIO DE 2012

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

So11a Soares, Eveline Kássia Braga
Avaliação das condições de temperatura e
concentração água ozonizada para a sanitização de alface
/ Eveline Kássia Braga Soares. --Campinas, SP: [s.n.],
2012.

Orientador: Armando Kazuo Fujii.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Hortaliças - Tecnologia pos-colheita. 2. Ozônio.
3. Alimentos - Microbiologia. 4. Alimento seguro. 5.
Alimentos - Vida útil. I. Fujii, Armando Kazuo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Agrícola. III. Título.

Título em Inglês: Evaluation of conditions temperature and ozonized water
concentration for sanitization of lettuce

Palavras-chave em Inglês: Vegetables - Post harvest technology, Ozone,
Food - Microbiology, Safe food, Food - Life

Área de concentração: Tecnologia pós colheita

Titulação: Mestre em Engenharia Agrícola

Banca examinadora: Neliane Ferraz de Arruda Silveira, Benedito Carlos
Benedetti

Data da defesa: 10-05-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Agrícola

Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Eveline Kássia Braga Soares**, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de maio de 2012, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

FEAGRI



Prof. Dr. Armando Kazuo Fujii – Presidente e Orientador
Feagri/Unicamp



Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira
ITAL



Prof. Dr. Benedito Carlos Benedetti – Membro Titular
Feagri/Unicamp

Faculdade de Engenharia Agrícola
Unicamp

“O dia em que quiserdes ter sabedoria com a mesma vontade que tens de respirar, então sereis um grande sábio.”

Arquimedes

À minha amada família, meus pais Fátima e Evaldo, minha irmã Évila e minha avó Vitória,
por todo o amor e confiança,

DEDICO

Ao meu maravilhoso Deus por nunca me desamparar,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por não me deixar desistir desta caminhada e estar sempre presente na minha vida.

À minha família pelo incentivo e orações e por compartilharem todas as minhas conquistas e serem meu porto seguro em todos os momentos de paz e tribulação. Em especial minha mãe Fátima pelo grande apoio na realização dos meus sonhos, meu pai Evaldo pela força e amor, minha irmã Évila e minha Vovó Vitória pelo amor incondicional.

Aos meus tios Dene e Paulo por todo apoio na fase inicial dessa jornada, não teria conseguido sem o auxílio de vocês.

Aos amigos-irmãos de sempre: Valéria Neves, Elias Júnior e Renan Maciel.

Ao meu amado Franck Azevedo, por toda a felicidade, amor, dedicação, compreensão, doação, paciência e carinho. Obrigada por compartilhar a vida ao meu lado, estando presente na saúde e na doença, na alegria e na tristeza. Os momentos de angústia tornaram-se mais amenos tendo você ao meu lado!

Aos amigos que amenizaram a saudade da família e fizeram Campinas se tornar um lar: Denize Oliveira, Glenda Neves, Michelle Gehrke, Fabíolla Damasceno, Luiz Julião, Allan Charles, Milla Alcântara, Thiago Lopes, Adriano Kia, Bruna Karoline, Lauren Souza e Márcio Diniz.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa (Processo Nº. 2011/50036-6).

Ao Prof. Dr. Armando Fujii, pela orientação.

Ao Prof. Dr. Sylvio Luis Honório, pela co-orientação.

À brilhante Profª Bel da FEA, pela paciência e ajuda na interpretação dos resultados.

Aos membros da minha banca examinadora, Drª Neliane Silveira e o Prof. Dr. Benedito Benedetti pelas contribuições ao trabalho.

Aos funcionários da FEAGRI pelo suporte no desenvolvimento dos experimentos: Giovani, Odenir, Rosália, Chico e em especial à Rosa Helena pela amizade e ajuda em toda a execução do trabalho e ao queridíssimo Pedro Fontes pelo excelente trabalho na instalação dos equipamentos, por sua amizade e pelas palavras gentis e incentivadoras.

Aos colegas da FEAGRI: Wesley Esdras, Audirene Amorim, Mara Bachelli, Vânia Nascimento, Rívia Amaral e Anna Silveira.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE TABELAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1. Alface.....	9
3.2. Alimento seguro.....	11
3.3. Fontes de contaminação.....	16
3.4. Sanitização.....	18
3.5. Ozônio.....	18
3.6. Atributos de Qualidade.....	21
3.6.1. Clorofila.....	22
3.7. Planejamento experimental.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Matéria prima.....	25
4.2. Sistema de refrigeração e gerador de ozônio.....	25
4.2.1 Linha aquosa.....	25
4.2.2 Linha gasosa.....	25
4.2.3 Obtenção de água ozonizada.....	25
4.3. Etapas do processo de pré e pós sanitização de alface tipo solta crespa ‘Vanda’. ...	26
4.4. Métodos de determinação.....	28
4.4.1 Determinação da concentração de ozônio dissolvido na água.....	28
4.4.2 Determinações microbiológicas.....	28
4.4.2.2. Coliformes Termotolerantes e E. Coli.	29
4.4.2.5. Análise de <i>Salmonella spp.</i>	29
4.4.3 Determinação indireta de clorofila (Índice SPAD – Soil Plant Analysis Development).....	30
4.5. Delineamento Experimental.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Análise microbiológica da água.....	32
5.1.1. Água de irrigação.....	32
5.1.2. Água do sistema público de abastecimento coletada no laboratório da FEAGRI	32
5.2. Contagem inicial de microorganismos presentes na alface tipo solta crespa ‘Vanda’.	33
5.3. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa ‘Vanda’ após tratamento com água refrigerada.	34
5.4. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa ‘Vanda’ nos tratamentos com água ozonizada.....	35
5.5. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa ‘Vanda’ sanitizada com água ozonizada, durante o armazenamento a 5°C.....	37
5.6. Índice de clorofila.....	39

5.7. Análise estatística.....	41
5.7.1. Efeito dos tratamentos com água ozonizada na redução microbiológica.....	41
5.7.2. Efeito dos tratamentos com água ozonizada na redução de clorofila.....	46
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alface tipo solta crespa.	11
Figura 2. Esquema de produção de água ozonizada.	26
Figura 3. Fluxograma geral do processo.	26
Figura 4. Superfície de resposta (A), curva de contorno (B) e valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo (C) para a resposta Bolores e Leveduras Dia 0	43
Figura 5. Superfície de resposta (A), curva de contorno (B) e valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo (C) para a resposta Mesófilos Dia 0.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios da composição de alface crespa em 100g de matéria fresca.	9
Tabela 2. Relação da temperatura e da solubilidade do ozônio em água.....	20
Tabela 3. Valores utilizados no Delineamento Composto Rotacional para a avaliação da sanitização de alface 'Vanda' com água ozonizada.....	30
Tabela 4. Matriz do delineamento experimental para a sanitização de alface 'Vanda', valores reais e codificados.....	31
Tabela 5. Valores utilizados no tratamento controle com água refrigerada.....	31
Tabela 6. Parâmetros microbiológicos da água utilizada para irrigação da planta de alface 'Vanda'	32
Tabela 7. Parâmetros microbiológicos da água do Sistema de Abastecimento público de água (SANASA - Campinas/SP)	33
Tabela 8. Contagem microbiológica inicial na alface tipo solta crespa 'Vanda'	34
Tabela 9. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa 'Vanda' tratada com água do sistema público de abastecimento em diferentes temperaturas.	35
Tabela 10. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa 'Vanda' sanitizada com água ozonizada por 1 minuto, em diferentes concentrações e temperaturas.....	36
Tabela 11. Contagem microbiológica de alfaces tipo solta crespa 'Vanda' nos tratamentos com água ozonizada por 1 minuto, nos dias 3, 6 e 9 de armazenamento a 5°C.	38
Tabela 12. Índice de clorofila em alface tipo solta crespa 'Vanda' nos tratamentos com água ozonizada durante os dias de armazenamento a 5°C.	40
Tabela 13. Coeficiente de regressão para a resposta Bolores e Leveduras durante 9 dias de armazenamento.	42
Tabela 14. Análise de variância para a resposta Bolores e Leveduras Dia 0.	43
Tabela 15. Coeficiente de regressão para a resposta Mesófilos durante 9 dias de armazenamento.	44
Tabela 16. Análise de variância para a resposta Mesófilos Dia 0.	45
Tabela 17. Coeficiente de regressão para a resposta Clorofila durante 9 dias de armazenamento.	47

RESUMO

A alface (*Lactuca sativa L.*) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, sendo a do tipo crespa a mais comercializada. O ozônio é um sanitizante de interesse por não gerar resíduos nos alimentos, destacando-se pelo seu alto poder oxidante e pela sua rápida degradação. Por ser um sanitizante recente no Brasil, ainda não há uma legislação específica que estabeleça os parâmetros para sua utilização a níveis seguros. O objetivo da pesquisa é avaliar as condições de concentração e temperatura da água ozonizada no processo de sanitização de alface. Através da ferramenta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) investigou-se o efeito das variáveis: concentração e temperatura de água ozonizada sobre a redução da carga microbiana de *Salmonella sp*, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, bolores e leveduras, aeróbios mesófilos e manutenção de clorofila. Foram utilizados as temperaturas de 5, 8, 15, 22 e 25°C e as concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 e 0,9 mg L⁻¹. Após o tratamento, a alface foi armazenada a 5±1°C sendo submetida à análise microbiológica e de clorofila após 3, 6 e 9 dias de armazenamento. A caracterização microbiológica da matéria-prima detectou a presença de *Salmonella* e *E. coli*. Os resultados mostraram que a alface tratada com água ozonizada nas concentrações de 0,5, 0,8 e 0,9 mg L⁻¹ permaneceu dentro dos parâmetros da legislação durante todo o período de armazenamento. A maior redução microbiológica ocorreu no tratamento com concentração de 0,9 mg L⁻¹ e temperatura de 15°C. As concentrações de 0,1 e 0,2 mg L⁻¹ não foram eficientes para a eliminação de *Salmonella* no tempo de contato de 1 minuto. Dentro das faixas estudadas nas duas variáveis, verificou-se que nenhuma delas teve influência estatisticamente significativa para a redução de clorofila.

Palavras-chave: pós-colheita de hortaliças; *Lactuca Sativa L.*; alimento seguro, ozônio.

ABSTRACT

EVALUATION OF DISTINCT SETS OF CONCENTRATION AND TEMPERATURE OF OZONATED WATER FOR SANITIZATION OF LETTUCE

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is the most leafy vegetable consumed in Brazil. Ozone is a sanitizer for food, especially for its high oxidizing power, rapid degradation, and without residue. Being a recent sanitizer in Brazil, there is no specific legislation that establishes the parameters for its use to safe levels. The objective of this research is to evaluate distinct concentration and temperature of ozonated water in the process of sanitizing lettuce. By a Central Composite Rotatable Design (CCRD) it was investigated the effect of variables: concentration and temperature of ozonated water on microbial load reduction of *Salmonella sp*, total coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli*, yeasts, and aerobic mesophilic as well as the effect on leaf chlorophyll. Different sets of Temperature (5, 8, 15, 22 and 25°C) and ozone concentration (0.1, 0.2, 0.5, 0.8 and 0.9 mg L⁻¹) were tested on *Salmonella* and *E. coli* contaminated lettuce for 1 minute. After the treatment, the vegetables were stored at 5±1°C and microbiological analysis and chlorophyll determination after 3, 6 and 9 storage days. The results showed that ozonated water at the concentrations of 0.5, 0.8, and 0.9 mg L⁻¹ killed *Salmonella* and *E. coli*. Most microbial reduction was observed in treatment concentration of 0.9 mg L⁻¹ and temperature of 15°C. The concentrations of 0.1 and 0.2 mg L⁻¹ were not effective eliminate *Salmonella*. None of the two variables were statistically significant to influence chlorophyll loss.

Keywords: post-harvest vegetables; *Lactuca sativa* L., safe food, ozone.

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa L.*) é a sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido no Brasil, sendo que a forma *in natura* é predominante em sua comercialização (MAISTRO, 2001).

Os sistemas produtivos de alface utilizam pouca tecnologia, ocasionando o decréscimo da produtividade da cultura nos períodos com alta sazonalidade, devido às operações de manuseio, embalagem e transporte inadequados, revelando problemas em todos os elos da cadeia produtiva (FONSECA, 2007). Acredita-se que 19% das perdas de alface são consequência de inadequados processos de embalagem, 17% de problemas no transporte, e 10% durante o manuseio (CEAGESP, 2010).

Este trabalho está inserido no projeto aprovado pela FAPESP 2011/50036-6 intitulado: Qualidade de alfaces em sistema integrado de colheita e pós-colheita. Nesse estudo, será abordada a etapa pós-colheita de alface, especificamente o processo de sanitização baseado nas normas das legislações vigentes.

A incorporação dos produtos químicos, como a utilização de sanitizantes deve ser apropriada, pois através dele é possível complementar um programa eficiente de sanitização (CHITARRA e CHITARRA, 1990).

Vegetais frescos apresentam riscos de contaminação, devido ao consumo *in natura* quando não são corretamente higienizados, destacando-se os folhosos pela grande manipulação em toda a cadeia de distribuição (SILOCHI, 2007). Esses vegetais têm sido identificados como veículos de bactérias patogênicas relevantes para a saúde pública, como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enterotoxigênica e *Escherichia coli* enterohemorrágica (O157:H7), além de protozoários, helmintos e vírus da hepatite A (FRANK e TAKEUSHI, 1999).

A contaminação de hortaliças ocorre antes e após a colheita, através do contato com o solo, irrigação com água contaminada, transporte e mão dos manipuladores (NASCIMENTO et al., 2005).

A etapa de sanitização é responsável pela qualidade microbiológica de hortaliças, consiste em submeter os vegetais a um tratamento que destrua ou reduza o número de microrganismos patogênicos, sem afetar a qualidade ou segurança do produto para o consumidor. Os sanitizantes mais usados no Brasil são os compostos clorados, por seu

baixo custo e eficiência, fácil aplicação e completa dissociação na água, porém estudos revelam que estes são desvantajosos pela produção e permanência de resíduos potencialmente tóxicos nos alimentos e pela demora no tempo de sua ação efetiva, de no mínimo 20 minutos (FDA, 2001; ANTONIOLLI et al., 2005).

O ozônio é utilizado como alternativa ao uso de compostos clorados com vantagens de não gerar resíduos nos alimentos, por ser um gás instável e se decompor rapidamente em oxigênio molecular. Dependendo do tipo de microrganismo, atua mais rápido que o cloro na inativação celular. Destaca-se pelo seu alto poder sanitizante e pela sua rápida degradação.

A utilização de ozônio como sanitizante de frutas e hortaliças ainda é recente no Brasil, o que torna seu uso limitado, não havendo até o momento uma legislação específica que estabeleça os limites seguros para sua utilização. Encontra-se na literatura diversos estudos que variam a concentração de ozônio utilizada, bem como o tempo de exposição. A concentração geralmente usada está na faixa de 1 a 2 ppm de ozônio, essas concentrações são consideradas prejudiciais à saúde e podem causar complicações no trato respiratório. A taxa de solubilidade do ozônio é inversamente proporcional a temperatura da água, usualmente, a produção de água ozonizada é feita com água a temperatura ambiente.

O presente trabalho visa sanitizar alface utilizando concentrações menores de ozônio e baixas temperaturas de água para alcançar o maior desempenho deste sanitizante. Acredita-se que as condições de concentração e temperatura de água ozonizada serão otimizadas através do uso do planejamento experimental e superfície de resposta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o desempenho da sanitização de alface utilizando água ozonizada variando-se a temperatura e concentração de ozônio.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a qualidade microbiológica da água utilizada na irrigação de alface e da água proveniente da rede de abastecimento;
- ✓ Avaliar a eficiência da sanitização de alface crespa (*Lactuca sativa L.*) através do uso de diferentes concentrações e temperaturas da água ozonizada em comparação as amostras controle, tendo como parâmetros a redução microbiológica de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, *Salmonella ssp.*, aeróbios mésófilos, bolores e leveduras;
- ✓ Verificar a influência da sanitização na manutenção de clorofila;
- ✓ Analisar as superfícies de resposta para os parâmetros estudados e encontrar as faixas otimizadas;
- ✓ Acompanhar o tempo de vida útil das alfaces durante o armazenamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Alface

Aspectos gerais da cultura de alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família Asteracea, é originária da Europa e da Ásia. Sua utilização como alimento é conhecida há milênios na Bacia do Mediterrâneo, apreciada pelos gregos na forma de salada crua. Foi introduzida no Brasil pelos Portugueses (GOTO e TIVELLI, 1998).

É a hortaliça consumida crua mais comercializada no Brasil, no Estado de São Paulo, o consumo é de aproximadamente dois quilos de alface por ano e 40% dos gastos totais dos paulistanos com verduras são destinados à compra de alface. É utilizada na confecção de lanches, saladas e decorações de pratos, apresenta sabor agradável e refrescante, sendo rica em sais minerais e vitaminas (OKURA; MARIANO; TEIXEIRA, 2006; CEAGESP, 2010).

A alface destaca-se pelo baixo teor calórico e importância alimentar por suprir o organismo com as vitaminas A, B1, B2, C e sais minerais de ferro e cálcio (OHSE, 1999).

A composição nutricional da alface crespa (Tabela 1) foi descrita pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2006).

Tabela 1. Valores médios da composição de alface crespa em 100g de matéria fresca.

Umidade (%)	Energia (kcal)	Proteína (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibra alimentar (g)	Cinzas (g)	Ca (mg)	Fe (mg)	Mg (mg)
96,1	11	1,3	0,2	1,7	1,8	0,7	38	0,4	11

Fonte: TACO (2006)

No Brasil, a área cultivada de alface é cerca de 35.000 hectares com a produção anual de aproximadamente dois milhões de toneladas, tendo como destaque o Estado de São Paulo com 7.300 hectares plantados, com a produção de cinco milhões de engradados e consumo por capita anual de 0,67 kg dessa folhosa (IBGE, 2006).

A alface é produzida em cinturões verdes próximos aos grandes centros consumidores por causa de sua rápida perecibilidade no período pós-colheita, oriunda de seu alto teor de água e grande área foliar. O processo de senescência de folhosas é

ocasionado pelo déficit hídrico e pela ação de diversas enzimas catalíticas (WILLS et al., 1981).

O volume de produção dessa hortaliça varia ao longo do ano em função das condições climáticas específicas de cada região. No Sul do Brasil, o seu cultivo passa por períodos pouco favoráveis, nos meses de inverno, com temperaturas baixas e precipitações pluviométricas prolongadas, retardando o crescimento e danificando as plantas. No verão com temperaturas elevadas e intensidade da radiação solar favorecem, sobretudo, o pendoamento precoce e ciclo curto (MAISTRO, 2001).

A maior produção da alface ocorre entre os meses de abril e dezembro, o que contribui para a redução dos preços. Entre os meses de janeiro e março, devido à incidência de chuvas, há redução na oferta e conseqüente aumento de preço do produto. A principal forma de comercialização da alface é ainda na forma *in natura* (EMBRAPA, 2006).

Cultivares de alface

Quanto à sua morfologia, a alface é uma planta herbácea delicada, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas por sua vez são amplas e crescem em volta do caule (em formato de roseta), podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma cabeça. Conforme a cultivar, a coloração pode ocorrer em vários tons de verde e roxo. O sistema radicular é ramificado e superficial. Na ocasião em que a planta é transplantada, o sistema radicular explora apenas os primeiros centímetros do solo (FILGUEIRA, 2000).

A alface predominante no Brasil é do tipo crespa, participando com 70% do mercado consumidor. O tipo americana detém 15%, a lisa 10%, enquanto outras correspondem a 5% do mercado (SALA e COSTA, 2005).

As cultivares de alface disponíveis no mercado brasileiro de sementes são agrupadas em cinco tipos morfológicos principais, com base na formação de cabeça e tipo de folhas. A utilizada neste estudo é a solta crespa (Figura 1), caracterizada por possuir folhas grandes e crespas, textura macia, mas consistente, sem formação de cabeça, pode ter coloração verde ou roxa (HENZ e SUINAGA, 2009).

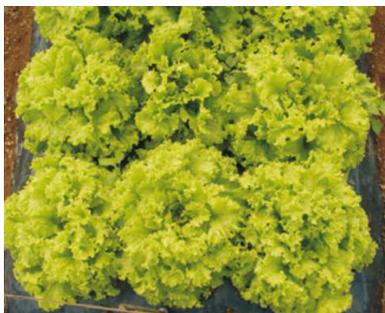


Figura 1. Alface tipo solta crespa.
Fonte: EMBRAPA (2006).

3.2. Alimento seguro

O alimento considerado seguro não deve apresentar risco significativo ao consumidor. Para os consumidores o risco deve ser igual a zero, enquanto que para os produtores de alimentos o risco é aceitável. A produção de alimentos seguros requer cuidados como controle da fonte, controle do desenvolvimento e do processo dos produtos, boas práticas higiênicas durante a produção, processamento, manipulação, distribuição, estocagem, venda, preparação e utilização, além de uma abordagem preventiva (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008).

De acordo com o CONSEA (2004) define-se segurança alimentar como a garantia a população de ter condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais e ainda, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo, assim, para uma existência digna em um contexto de desenvolvimento integral da pessoa humana.

Qualidade higiênico sanitária de alface

Usualmente consumida crua, a alface tem no processo de higienização o único tratamento recebido entre o cultivo e a comercialização. Se o processo de sanitização não for realizado, poderá propiciar a transmissão de diversas doenças (NASCIMENTO, 2002).

Após a colheita, a alface recebe alguns processos que podem afetar a sua segurança microbiológica, devido o contato humano para a imersão na água e o corte. Nessa manipulação existe potencial para contaminar o produto com as bactérias patogênicas, assim como a possibilidade em favorecer o crescimento destes contaminantes (BRACKETT, 1994).

A alface pode ser um veículo transmissor de microrganismos patogênicos ao homem, uma vez que esta se encontra muito próxima do solo, aumentando o risco de

contato com esses contaminantes quando presentes no solo, na água, nos insumos naturais propiciando o desenvolvimento e a sobrevivência dos mesmos. Esta possível contaminação pode alterar as características físicas e químicas do alimento e ser responsável por intoxicações e infecções (LOTTO, 2008).

A Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece padrões de tolerância microbiológica para alimentos, estando nessa categoria hortaliças consumidas cruas. Essa resolução foi criada com o intuito de diminuir os casos de internações devido a doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2001).

Contaminação microbiológica

A microbiota é um fator importante na qualidade e conservação dos vegetais. A presença de microrganismos pode ser decorrente do manuseio inadequado prejudicando a qualidade sensorial bem como a segurança desses produtos (PEREIRA; MIYA; MAISTRO, 2001).

Independente do sistema de cultivo, hortaliças apresentam um alto potencial de crescimento de microrganismos patogênicos, constituindo um meio em potencial de transmissão de várias doenças infecciosas. Dentre esses alimentos, as hortaliças folhosas se destacam como um dos veículos de contaminação mais significativos (LOTTO, 2008).

O ataque por microrganismos é causa importante nas perdas pós-colheita dos produtos perecíveis, incluindo-se tanto os vegetais crus como os processados minimamente (CHITARRA e CHITARRA, 1990). Frutas e hortaliças apresentam atividade de água (Aw) em torno de 0,95, o que facilita o desenvolvimento de muitos microrganismos (BRACKETT, 1994).

As bactérias Gram-negativas constituem a microbiota característica dos vegetais *in natura*, formada por microrganismos provenientes do próprio solo, representada pelo gênero *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter* e também por bactérias Gram-positivas como *Bacillus* spp. além de bolores e leveduras (BRACKETT, 1994).

A verificação das condições higiênico-sanitárias é realizada por meio da determinação da presença de coliformes termotolerantes (a 45°C), que são bactérias bioindicadoras de qualidade higiênico-sanitária, e de *Salmonella* spp., um enteropatógeno envolvido em diversos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em muitos países (BRASIL, 2001).

A contaminação por microrganismos é evitada utilizando matéria-prima de boa qualidade, adotando medidas preventivas durante todo o processamento, aplicando uma correta higienização tanto para equipamentos e utensílios quanto para manipuladores e condições adequadas de conservação (RIEDEL, 2005).

Lotto (2008) avaliou a contaminação de alface por coliformes termotolerantes e *E. coli* em cultivos de sistema orgânico e convencional e verificou que em ambos os tipos de cultivo, as hortaliças estavam contaminadas.

Montanher et al. (2007), realizaram uma avaliação parasitológica em alfaces comercializadas em restaurantes na Cidade de Curitiba verificando que de um total de 50 amostras analisadas, 10% (5 amostras) apresentaram algum parasita intestinal e 90% das amostras se mostraram negativas quanto à presença de enteroparasitas.

A presença de microrganismos em hortaliças depende principalmente da flora microbiana inicial, destacando-se as técnicas de cultivo (uso de adubo orgânico; utilização de águas contaminadas para irrigação), beneficiamento (falta de higiene pessoal no momento da manipulação dos alimentos e das superfícies de contato com o alimento), armazenamento inadequado (controle térmico e gasoso), transporte (em engradados abertos e ambiente não refrigerado) e distribuição para consumo (falta de higiene), podem também representar fontes de contaminação e disseminação (PACHECO et al., 2002).

Microrganismos indicadores

Para a vigilância sanitária, são pesquisados microrganismos indicadores que, quando presentes em alimentos, fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, possível presença de patógenos ao homem, deterioração do alimento e denuncia a falta de boas práticas de fabricação durante o processamento e manipulação dos mesmos. Entre os indicadores mais analisados em alimentos estão bolores e leveduras, os aeróbios mesófilos, coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*. (BRASIL, 2001)

Bactérias aeróbias mesófilas

A presença de bactérias aeróbias nos alimentos são bons indicativos da qualidade sanitária dos alimentos. Mesmo que microrganismos patogênicos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações sensoriais do alimento, a presença de um número elevado de mesófilos indica que a alimento é insalubre, sendo evidenciado que houve condições favoráveis ao desenvolvimento desse microrganismo, como o uso de matérias-primas

contaminadas, processamento insatisfatório ou erros durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura (FRANCO e LANDGRAF, 2006).

Bolores e leveduras

Bolores e leveduras caracterizam-se por indicar a eficiência do processo de sanitização de equipamentos e utensílios durante o processamento de alimentos, são considerados agentes potenciais de deterioração, com o poder de oxidação de diferentes substratos como os carboidratos. Esses microrganismos estão presentes no solo ou no ar, resistentes a condições adversas, como pH ácido, baixa atividade de água e a temperatura ótima de desenvolvimento encontra-se na faixa de 25 a 28°C, fazendo com esses microrganismos não se desenvolvam em temperaturas de refrigeração (BRITO e ROSSI, 2005; SILVA J. et al., 2007).

Além de reduzir a vida útil dos produtos, um grande número de fungos produz micotoxinas, as quais oferecem perigo para a saúde do consumidor, causando danos no sistema nervoso e circulatório (PARKER, 2004).

Salmonella ssp

O gênero *Salmonella* spp. é composto por microrganismos bastonetes Gram negativos, não esporulados, mesófilos, anaeróbios facultativos e desenvolvem-se bem a 37°C. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais, como répteis e animais de granja, mas também podem ser encontrados em outras partes do corpo (JAY, 2005).

Todos os sorotipos de *Salmonella* são considerados patogênicos, causando intoxicação ou infecção alimentar. O sorotipo mais virulento, *S. typhi*, causa a febre tifóide, uma doença grave relacionada principalmente à ingestão de alimentos contaminados. Outras doenças causadas por essa bactéria são a febre entérica e enterocolite e salmonelose. (PARKER, 2004; FRANCO e LANDGRAF, 2006).

Segundo Guimarães et al. (2001), as bactérias deste gênero são os principais agentes responsáveis por surtos de origem alimentar em diferentes partes do mundo, sendo que estes vêm aumentando mesmo com o crescente desenvolvimento de tecnologias de conservação.

Jay (2005) explica que a infecção alimentar causada por *Salmonella* ocorre por meio da ingestão de alimentos que contenham uma contagem significativa, os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão dos alimentos. Consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia. A taxa de mortalidade é de

4,1%, em média. Deste percentual, 5,8% correspondem aos casos que ocorrem durante o primeiro ano de vida, 2% entre o primeiro e os 50 anos e de 15% em pessoas acima de 50 anos.

De acordo com Guimarães et al. 2001, a implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o qual abrange todo o processamento, desde a matéria-prima até o produto final ajuda a reverter quadros de infecções.

Coliformes Totais (35°C)

O grupo coliforme é composto por microrganismos originários do trato gastrointestinal de humanos e animais, e também, por algumas bactérias não entéricas, como espécies de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Os coliformes totais são bastonetes Gram negativos, não esporulados, que fermentam a lactose dentro de 48 horas produzindo ácido e gás a 35°C, e comumente são utilizados como bioindicadores de contaminação em alimentos (JAY, 2005).

A presença de coliformes totais não confirma que a contaminação seja de origem fecal, indica apenas falhas durante o processamento do produto em decorrência de práticas higiênico-sanitárias deficientes (FURLANETO; SANTINI; VELASCO, 2005).

Coliformes Termotolerantes

De acordo com Jay (2005), os coliformes termotolerantes também são bastonetes Gram negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose, porém em temperaturas maiores, 44 - 46°C em um período de 24 horas. Esse grupo de microrganismos também é conhecido como coliformes fecais, por compreender apenas as bactérias originárias do trato gastrointestinal.

O grupo dos coliformes termotolerantes é composto de três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo apenas o primeiro de origem fecal, estando presente no trato intestinal do homem e de animais de sangue quente. Devido a este fato, pesquisas de coliformes termotolerantes em alimentos são menos eficientes do que a pesquisa direta de *E. coli* (SILVA N. et al., 2007).

Escherichia coli

Em 1945, no Brasil, teve-se conhecimento sobre a contaminação fecal em hortaliças como a alface, após pesquisadores detectaram presença de *Escherichia coli* em 29,3% de hortaliças diversas comercializadas na cidade de São Paulo (GELLI et al., 1979).

Do grupo dos coliformes termotolerantes, a bactéria *Escherichia coli* é a representante de maior relevância em alimentos, em 2003, ocupou o segundo lugar entre os agentes causadores de toxinfecções alimentares nos EUA, onde é responsável por 7,4 % dos surtos e por 28,6 % das mortes provocadas por bactérias no período de 1993 a 1997 (SILVA et al., 2003).

A presença da enterobactéria *E. coli* em um alimento ou na água representa contaminação de origem fecal, indicando condições higiênicas insatisfatórias. Aproximadamente 95% dos coliformes presentes em fezes humanas e de animais de sangue quente são *E. coli*, o que a faz ser o melhor indicador de contaminação fecal, por satisfazer todas as exigências de um indicador ideal. Essa bactéria é patogênica ao homem e para os animais (SILVA S. et al., 2007; FRANCO e LANDGRAF, 2006).

3.3. Fontes de contaminação

O acesso de microrganismos patogênicos aos vegetais ocorre quando os mesmos são expostos, ainda no campo, aos riscos de fertilização com dejetos humanos e de outros animais e à irrigação com água contaminada, contribuindo para a presença de agentes etiológicos em diversas enfermidades infecto-contagiosas e parasitárias que normalmente estariam ausentes (BEUCHAT, 1996).

A contaminação por microrganismos patogênicos pode ocorrer direta ou indiretamente por fezes, animais ou insetos, solo, água de irrigação e água de lavagem contaminadas, equipamentos mal higienizados e manipuladores com higiene pessoal deficiente (TEIXEIRA, 2002).

Água de irrigação

A agricultura mundial é a atividade humana que mais consome água, cerca de 70% de todo o volume consumido no planeta, sendo a irrigação a atividade de maior demanda. Com frequência a agricultura irrigada utiliza águas de açudes, arroios, lagoas e esses podem apresentar contaminantes biológicos como coliformes de origem fecal quando associada a descargas de esgotos domésticos ou até mesmo a presença de animais próximos a essas áreas (SOUTO, 2005; ALVES et al., 2007).

O escoamento da água de irrigação é feito através de bombas desde o rio até as hortas, sem qualquer tratamento prévio podendo vir a ser uma fonte potencial de

enteropatógenos para o vegetal que será irrigado (OLIVEIRA e GERMANO, 1992; ROSA e MARTINS, 2001).

Acredita-se que o aumento das concentrações de coliformes nas águas de irrigação se deve ao fato das adubações serem feitas nos canteiros das áreas irrigadas, com matéria orgânica de origem animal que, sob recarga da irrigação e da precipitação, lixívia parte da matéria orgânica, carreando microrganismos patogênicos para o aquífero freático (PAULA; KATO; FLORÊNCIO, 2005).

A forma mais precisa de estimar a qualidade da água em relação à sua potabilidade, são os testes que determinam os indicadores de contaminação fecal. Dentre os mais utilizados destacam-se a quantificação de coliformes totais e fecais, seguida da enumeração de bactérias aeróbias mesófilas (BOMFIM et al., 2007).

A ausência de proteção dos recursos hídricos, principalmente das excretas humanas ou de animais, pode introduzir uma série de organismos patogênicos, como vírus, bactérias, protozoários ou helmintos de origem intestinal, tornando a água um dos principais veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa. As doenças de veiculação hídrica são transmitidas pela rota oral fecal, através da ingestão de água ou até mesmo de alimentos contaminados por microrganismos. A água de irrigação é uma fonte de contaminação de hortaliças podendo apresentar grande quantidade de contaminantes quando associada a descarga de esgotos ou até mesmo a presença de animais pastando próximo a essas áreas (FEACHEM et al, 1983; OMS, 1989; PACHECO et al., 2002; AMARAL, et al 2003).

Sá et al. (2005) estudaram a qualidade microbiológica da água proveniente da rede de abastecimento em Belém e as amostras foram consideradas impróprias para o consumo de acordo com o padrão da Portaria MS/GM no 518/04, que tratam do padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano.

Estudo realizado por Rigolin-Sá e Pereira (2005) sobre a qualidade higiênico sanitária da água utilizada em hortas na cidade de Passos-MG, revelou elevada concentração de coliformes fecais (Termotolerantes), acima do máximo permitido pela legislação. Do total de 15 hortas analisadas, 60% apresentaram níveis de contaminação acima do recomendado.

Bonilha (1986) estudando águas utilizadas na irrigação de alfaces em São Paulo, encontrou valores máximos de até $2,4 \times 10^6$ UFC por 100 mL. Paula et al. (2005) avaliando os aspectos sanitários da água usada na irrigação de hortaliças em Recife, encontrou

concentrações de média, máxima e mínima de coliformes fecais apresentando variações de $1,5 \times 10^3$ a $2,2 \times 10^3$ UFC; $2,0 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^3$ a $1,3 \times 10^3$, respectivamente.

Dentre os principais usos da água, o abastecimento público é o uso mais exigente, considerando que a água potável deve atender aos parâmetros microbiológicos, físicos, e químicos definidos pela legislação vigente e não oferecer riscos à saúde do consumidor (BRASIL, 2004).

3.4. Sanitização

A eficácia da operação de lavagem é potencializada com a inclusão de antimicrobianos ou desinfetantes nessa água de lavagem. O uso de soluções desinfetantes na água de lavagem de hortaliças reduz a contaminação e resulta em produtos microbiologicamente seguros. Essa operação tem a finalidade de reduzir a carga microbiana inicial, naturalmente presente nesse tipo de produto (BEUCHAT, 1999; KIM, 1999).

A sanitização visa reduzir a população microbiana presente, com a destruição das membranas dos contaminantes através da desinfecção superficial do produto, impede ou minimiza a transferência de microrganismos presentes na água para o produto, e quando presente no produto, previne a transferência destes à superfícies não contaminadas. Quando feita corretamente, a operação de sanitização corresponde à eliminação de aproximadamente 90% da flora microbiana presente (SUSLOW, 1997).

3.5. Ozônio

Histórico

O ozônio é permitido na Europa, como desinfetante de água para o consumo humano desde 1893. Nos Estados Unidos, somente no ano de 1982 o FDA (Food and Drug Administration), por considerá-lo substância GRAS (Generally Recognized as Safe), liberou seu uso no processo de lavagem de garrafas para comercialização de água (USDA, 1997).

Data de 1909 a primeira utilização do ozônio como agente conservante de alimentos, na forma gasosa, em câmaras frias de estocagem de carnes. Seu uso como sanitizante na indústria de alimentos ainda é limitado, devido ao custo elevado em relação a outras substâncias como o cloro, que por ser barato e eficiente, passou a ser o agente primordial na indústria mundial para esse fim. Porém os compostos clorados vêm sofrendo

restrições desde 1975 após a descoberta que sua aplicação em materiais orgânicos poderia gerar compostos organoclorados (Trihalometanos – THM) os quais são potencialmente cancerígenos (WEI; COOK; KIRK, 1985).

Em 1997, o ozônio foi oficialmente reconhecido como agente sanitizante seguro, pelo EPRI (Electric Power Research Institute), ampliou as possibilidades para a sua aplicação na indústria de alimentos e outros setores (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004).

Propriedades do ozônio

Ozônio (O₃) é o oxigênio triatômico, sendo um gás incolor com odor característico e pungente, cujo peso molecular é 48, o ponto de ebulição é -111,9°C e o ponto de fusão é -192,7°C a 1 atm. É gerado naturalmente na estratosfera em pequenas concentrações (0,05 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 (O₂), resultando em dois átomos de oxigênio livre que se ligam rapidamente a outras duas moléculas de oxigênio e formam o ozônio (MAHMOUD E FREIRE, 2007).

O ozônio é um agente oxidante e esterilizante muito poderoso quando comparado a outros agentes oxidantes, permitindo que esta espécie possa reagir com uma numerosa classe de compostos, em fase aquosa, o ozônio decompõe-se rapidamente a oxigênio (MANSTEN e DAVIES, 1994; KUNZ et al., 1997).

A ação do ozônio ocorre em pequenas concentrações e curto tempo de contato, sendo suficiente para inativar bactérias, fungos, esporos, vírus e protozoários. A suscetibilidade dos microrganismos e sua ação dependem do tipo de produto, da dose, do método de aplicação (água ozonizada ou gás), temperatura, pH do meio, umidade relativa e presença de substâncias orgânicas (PRESTES, 2007).

Por ser instável, o ozônio não pode ser armazenado, logo é preciso gerá-lo *in situ*. O método mais difundido para a geração de ozônio é o de descarga por efeito corona, atualmente utilizado em praticamente todos os ozonizadores disponíveis comercialmente (Da SILVA; SANTANA; BOODTS, 2003). Através desse método, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 10000 V). Isto causa a dissociação do oxigênio, sendo a formação do ozônio consequência da recombinação de espécies radiculares de oxigênio, com moléculas de oxigênio presentes no sistema (MANOUSARIDIS, 2005).

A taxa de solubilidade do ozônio depende do tamanho das bolhas do gás que borbulham na água, pois quanto menores as bolhas formadas, maior a superfície de contato. O fluxo do ozônio e o tempo de contato também afetam a transferência do gás para a água. A agitação da amostra incrementa o contato e a solubilização (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001).

Tem sido aceito que a solubilidade do ozônio na água siga a lei de Henry, significando que a concentração de saturação é proporcional à pressão parcial do ozônio a uma determinada temperatura (DI BERNARDO, 1993).

Em fase aquosa, o ozônio é relativamente instável e decompõe-se facilmente na forma do oxigênio molecular. A estabilidade do ozônio em solução aumenta com a redução de temperatura (Tabela 2).

Tabela 2. Relação da temperatura e da solubilidade do ozônio em água.

Temperatura (°C)	Solubilidade (litros de ozônio/litros de água)
0	0,640
15	0,456
27	0,270
40	0,112
60	0,000

Fonte: RICE, 1996.

Atuação do ozônio nos microrganismos

Na inativação de bactérias pelo ozônio, ele ataca vários constituintes celulares como proteínas, lipídios insaturados e enzimas da membrana celular, peptoglicanas da parede celular, enzimas, ácidos nucléicos do citoplasma além de proteínas e peptoglicanas da capa dos esporos bacterianos e capsídeos virais (KHADRE; YOUSEF; DAVES, 2001). O fator que diferencia o ozônio dos demais sanitizantes é seu mecanismo de ação na destruição dos microrganismos. O cloro atua por difusão através da parede celular, agindo sobre os elementos vitais localizados no interior da célula, como enzimas, proteínas, DNA e RNA. O ozônio age diretamente na parede da célula, causando sua ruptura e morte em menor tempo de contato, inviabilizando a recuperação dos microrganismos após o ataque.

Cavalcante (2007) estudou alface americana previamente contaminada e os resultados demonstraram que 1,0 mg L⁻¹ de água ozonizada no tempo de 1 minuto, na ausência de matéria orgânica, é suficiente para reduzir, no mínimo, 6,57 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7.

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. Não se acumula em tecido gorduroso nem causa efeitos crônicos ao longo do tempo, podendo ser usado na reciclagem da água (GREENBERG, 1981; SHELDON e BROWN, 1986; MCKENZIE et al., 1997; SOPHER et al., 2002).

Efeito do ozônio na saúde humana

A sensibilidade do olfato humano detecta a presença de ozônio pelo seu odor característico a concentrações entre 0,02 a 0,04 ppm (PEZZI, 2009).

Segundo Guillen (2008), a exposição excessiva ao ozônio em altas concentrações por várias horas, resulta em lacrimação, náuseas, cefaléia e dificuldades respiratórias como irritação das vias respiratórias superiores, respiração superficial e congestão pulmonar

Tem sido aceito a utilização de 0,1 ppm de ozônio no ar, para um período de 40 horas semanais e o valor máximo limite para tempo de exposição de 10 minutos igual a 0,3 ppm de acordo com o estabelecido pelo TVL (*Threshold Limit Value*) (BASSANI, 2003).

Cavalcante (2007), Prestes (2007) e Bachelli (2010) utilizaram ozônio para sanitização de alface em quantidades de 1 a 1,5mg L⁻¹. A exposição humana nessas quantidades por longas jornadas de trabalho é prejudicial à saúde, como já mencionado anteriormente, logo, optou-se neste estudo, por trabalhar com faixas de concentração inferiores a 1mg L⁻¹ de ozônio.

3.6. Atributos de Qualidade

A qualidade de frutos e hortaliças corresponde ao conjunto de propriedades que os tornam aceitáveis como alimentos. De uma forma geral, a qualidade pode ser definida como o conjunto de características, que diferenciam componentes individuais de um mesmo produto e que tem reflexo na aceitação por parte do consumidor. As propriedades que tornam frutos e hortaliças apreciados como alimento, dizem respeito à aparência, sabor, odor, textura e valor nutritivo (CHITARRA e CHITARRA, 1990).

Alguns atributos de qualidade não são influenciados pelo processo de sanitização. Bacheli (2010) e Prestes (2007) estudaram o influência do processo de sanitização de alface utilizando ozônio nos atributos sensoriais e verificaram que nem a quantidade e nem o tipo de sanitizante influenciam nesse atributo.

3.6.1. Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais verdes mais abundantes presentes nas plantas, aproximadamente 75% dos pigmentos verdes encontrados nos tecidos vegetais. Ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais, participam do processo de fotossíntese de plantas. Possui tom verde oliva e são obtidas de vegetais ou parte de vegetais (GROSS, 1991; ELBE e FENNEMA, 2000; DOWNHAM e COLLINS, 2000).

As clorofilas captam luz na fotossíntese, sua concentração é um parâmetro importante na avaliação da qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças, fornecendo informações como grau de amadurecimento, estado de conservação e nutrição mineral. Fatores como luz e temperatura afetam o processo de degradação das mesmas. Em muitos tecidos, a perda da clorofila é parte da transição dos cloroplastos, que contêm pigmentos carotenóides amarelos e vermelhos. Sua função é converter energia luminosa em energia química, processo que ocorre nos cloroplastos (STREIT et al., 2005).

As perdas de clorofila em folhosas como a alface constituem um fator de grande importância na qualidade. A modificação da cor pode ocorrer devido à degradação de clorofila, que desmascara pigmentos já presentes. O teor de clorofila é um dos parâmetros mais eficazes na avaliação da qualidade pós-colheita, indicando o grau de senescência das folhosas além de fornecer informações como o grau de amadurecimento, estado de conservação e nutrição mineral (SILVA, 1980; MEDINA et al., 1982; SILVA J. et al., 2007).

A coloração refere-se ao atributo de qualidade mais atrativo ao consumidor e decisivo no momento da aquisição do produto, variando entre espécies e cultivares. A perda de cor verde deve-se à decomposição estrutural da clorofila, em decorrência de vários fatores que atuam isoladamente ou em conjunto, sendo eles o pH, temperatura e presença ou ausência de luz (CHITARRA e CHITARRA, 1990).

A ingestão de clorofila promove efeitos estimulantes no crescimento de tecidos, atuando como uma substância promotora da multiplicação de fibroblastos, células do tecido conjuntivo, responsáveis pelo processo de cicatrização. Em função do seu elevado conteúdo de clorofila, as hortaliças contribuem para compor a ingestão diária dos comumente necessários para uma alimentação balanceada e saudável (TANAKA, 1997; SOURCI e FACHAMANN, 1995).

A degradação da clorofila em folhosas constitui um fator importante na qualidade durante o período de comercialização. Alterações de cor estão relacionadas ao

amadurecimento, considerado um atributo chave juntamente com a textura, para determinar a qualidade comestível das folhosas. A alteração da cor pode ocorrer devido à degradação da clorofila, que por sua vez, desmascara pigmentos que já estão presentes. Esse processo de desverdecimento é também acompanhado pela síntese de novos pigmentos (SILVA J. et al., 2007).

A perda da cor verde é atribuída à decomposição estrutural da molécula do pigmento em decorrência de fatores que atuam isoladamente ou em conjunto, sendo um deles a temperatura. A temperatura encontra-se diretamente relacionada à atividade metabólica, podendo interferir no nível de degradação do pigmento (HEATON e MARAGONI, 1996).

Na determinação da clorofila pelos métodos convencionais existe o inconveniente dos tecidos vegetais serem destruídos, utilização de reagentes, além de requerer mão de obra e tempo, desde o preparo das amostras até as análises, necessitando em torno de quatro horas para determinar 20 amostras (RODRIGUEZ et al., 1998).

Neste experimento, utilizou-se o clorofilômetro Minolta 502. O clorofilômetro possui diodos que emitem radiação em 650 nm (luz vermelha) e 940 nm (radiação infravermelha). A luz passa pela folha e é recebida por um fotodiodo de silicone, inicialmente é convertida em sinais elétricos analógicos em seguida em sinais digitais. Esses sinais passam por um microprocessador que calcula valores proporcionais do teor de clorofila presentes na planta (JESUS e MARENCO, 2008).

3.7. Planejamento experimental

Em 1950 Box, Hunter e Hunter (1978) introduziram o planejamento experimental e com o advento da globalização, trouxe a facilidade do uso de softwares para análises estatísticas, desde então, sua utilização vem crescendo significativamente (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Segundo Rodrigues e Iemma (2009), a utilização de planejamento experimental para otimização de processos produtivos é um diferencial para planejar criteriosamente e se chegar às condições ótimas mais rapidamente, a um menor custo e com o suporte estatístico na discussão dos resultados. Assim, o planejamento experimental proporciona a quantificação dos efeitos das variáveis do processo sob as respostas desejadas. Como vantagens tem-se a redução das repetições com conseqüente redução dos custos e do tempo da pesquisa, otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo, além da possibilidade

de calcular o erro experimental que é responsável pelo nível de confiança estatística da estimativa de reprodutibilidade do experimento.

Delineamento Composto Central Rotacional e Metodologia de Superfície de Resposta

O Delineamento Composto Central (DCCR) é uma metodologia que facilita a investigação de um espaço amostral com um menor número de ensaios. Com a finalidade de auxiliar na otimização de um processo que utiliza o DCCR, faz-se o uso da metodologia de superfície de resposta (MSR), desenvolvida por Box e Wilson em 1951 ((BOX; HUNTER, H; HUNTER, J., 1978).

Rodrigues e Iemma (2009) recomendam o uso de um Delineamento composto Central Rotacional quando o estudo tiver de duas a três variáveis independentes (respostas). A metodologia de planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de resposta, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX; HUNTER, H; HUNTER, J., 1978).

A metodologia de superfície agrupa técnicas de análise e planejamento de experimentos empregados na modelagem matemática de respostas, identificando a interação existente entre os fatores (variáveis dependentes) e sua influência nas respostas (variáveis independentes) do processo analisado. Essa metodologia compreende um grupo de técnicas matemáticas e estatísticas para a construção e exploração de modelos empíricos, usados para desenvolver, melhorar e otimizar processos, os resultados experimentais indicam uma combinação de níveis dos fatores dentro de uma região ótima. A ferramenta é eficiente para a otimização de processos que envolvem inúmeras variáveis. (MYERS, 1999; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002; MONTGOMERY, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria prima

O experimento de sanitização foi realizado em novembro de 2011, utilizando-se como matéria prima a alface tipo solta crespa 'Vanda', adquirida de um produtor no Sítio Noda s/n, Colônia Tozan, Rodovia Campinas Mogi Mirim, Km 10, Campinas-SP. As alfaces foram colhidas pela manhã, com um corte manual, acima do solo, abaixo da última inserção de folhas. Em seguida foram acondicionadas em caixas plásticas com dimensões de 0,40x0,60x0,22m, contendo 12 unidades de alface cada uma. As caixas foram transportadas ao Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita (LTPC), da Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e estocadas em câmara frigorífica a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.2. Sistema de refrigeração e gerador de ozônio

O equipamento foi montado no LTPC da FEAGRI.

4.2.1 Linha aquosa

A água utilizada era proveniente da rede de abastecimento de Campinas, passou por filtro de carvão ativado e foi resfriada em sistema da DeLaval (PF 05892, 7500 BTU) com capacidade de 300 L dotado de um sistema de refrigeração de 3000 kcal, através de parede encamisada. Para atingir a temperatura mínima de 5°C , foi necessário recircular a água durante 4 h a vazão de 2000 L h^{-1} .

4.2.2 Linha gasosa

Na geração de ozônio utilizou-se um cilindro de oxigênio (95 a 99% de pureza - White Martins e pressão original de 30 psi, reduzida para 2 psi) que alimentou o gerador de ozônio (Modelo DCGM-2007/ Ecozon®) onde foi convertido à ozônio através de carga elétrica gerada no sistema corona, fornecido pelo capacitor a 220 V. A capacidade da célula geradora de ozônio variava de 0 a 2mg min^{-1} conforme ajuste do potenciômetro.

4.2.3 Obtenção de água ozonizada.

Após o resfriamento, a água foi bombeada a uma vazão de 2000 l/h, passando através da válvula Venturi (Modelo Mazzei 584, vazão mínima = 2000l/hora de água), no qual, por sucção, o ozônio foi misturado à água, produzindo água ozonizada.

A água ozonizada circulou no tanque de sanitização através da tubulação perfurada situada no fundo do tanque, margeando o perímetro da parede, este artifício permitia que a distribuição fosse uniforme. Ao atingir o volume desejado, a água era recirculada pelo tanque de refrigeração e continuou sendo feita a sucção de ozônio para manter a concentração desejada.

A Figura 2 ilustra o processo de obtenção de água ozonizada.

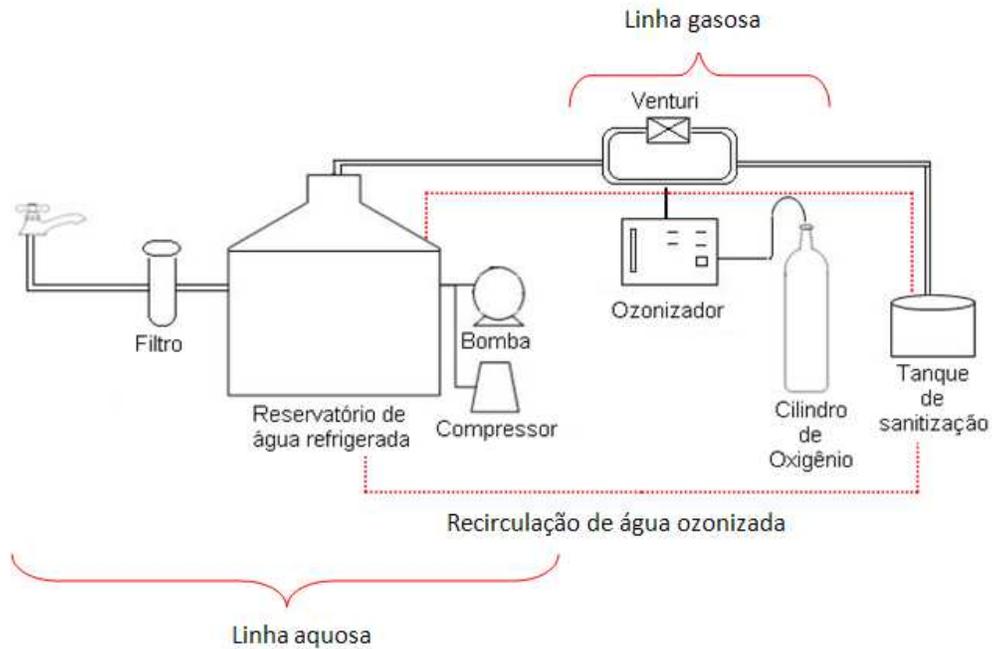


Figura 2. Esquema de produção de água ozonizada.

4.3. Etapas do processo de pré e pós sanitização de alface tipo solta crespa ‘Vanda’.

As etapas do processo de sanitização podem ser visualizadas na Figura 3 e serão descritas a seguir.



Figura 3. Fluxograma geral do processo.

4.3.1. Toalete

Foi realizada manualmente e para fins de descarte foram consideradas as folhas não íntegras e murchas.

4.3.2. Lavagem

Foi realizada em tanque de aço inoxidável com dimensões de 0,64x0,69 x 0,71m, contendo água da rede de abastecimento. As alfaces foram imersas manualmente, durante um minuto, duas por vez, e foram acondicionadas em caixas plásticas previamente sanitizadas com água ozonizada. A água de lavagem era trocada a cada 10 alfaces lavadas. A temperatura da água de abastecimento nesse momento era de 23°C. Foram lavadas 160 alfaces.

4.3.3. Tratamentos de sanitização por imersão

a. Controle

Foram utilizadas 10 amostras de alface para o tratamento controle, lavando com água da rede de abastecimento nas temperaturas de 5, 8, 15, 22 e 25°C, imersas por um minuto, utilizando uma caixa vazada com dimensões de 0,41x0,39x0,17 m e uma grade de apoio (0,58x0,42 m) para cobrir a caixa. Foram imersas 4 unidades de alface por vez, em seguida mais 4 e por fim duas.

b. Água ozonizada

A sanitização das amostras com água ozonizada foi feita igualmente como nas amostras controle, nas mesmas condições de temperatura, 10 alfaces por tratamento.

As concentrações de ozônio na água foram de 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 0,9 mg L⁻¹ obtidas através da regulagem do potenciômetro do gerador de ozônio.

Foram coletadas amostras da água ozonizada antes e depois da imersão, para monitoramento da concentração de ozônio. A temperatura da água foi monitorada por termômetros digitais localizados dentro do tanque de água refrigerada e dentro do tanque de sanitização.

4.3.4. Drenagem

Após retirada do tanque, as plantas de alface foram seguradas pelo caule, com as folhas para baixo, agitadas manualmente, durante um minuto, para completar esse processo, ficavam em repouso sobre uma bancada de aço inoxidável previamente sanitizada com água ozonizada.

4.3.5. Embalagem

As alfaces foram acondicionadas, individualmente, em embalagens de polietileno de baixa densidade com dimensões de 0,035x0,045 e espessura de 0,0006 m e fechadas com seladora Marca Barbi TI400.

4.3.6. Armazenamento sob refrigeração

O armazenamento foi realizado em câmara frigorífica (Modelo MZM 213 T01F/Termoprol Zanotti) à temperatura de 5°C por nove dias, sendo que a cada três dias foi retirada uma amostra para realizar as análises microbiológicas e teor indireto de clorofila.

4.4. Métodos de determinação

4.4.1 Determinação da concentração de ozônio dissolvido na água

Foram coletas amostras de água ozonizada antes e após a imersão da alface no tanque de sanitização, para isso, utilizou-se o kit ozônio K7403/CHEMetrics. As amostras foram coletas em um Becker e transferia-se 25mL para uma cubeta onde foi quebrada uma ampola que era responsável pela a sucção da amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (DR/2010 da HACH) por absorvância (abs), sendo os valores da concentração (C_{O_3}) expressos em $mg L^{-1}$, de acordo com a Equação 1:

$$C_{O_3} (mg L^{-1}) = 2,37 (abs) + 0,01 \quad (1)$$

4.4.2 Determinações microbiológicas

a. Água

Foram realizadas, em triplicata, análises microbiológicas (coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*) nas águas utilizadas para irrigação das plantas de alface, originária do subsolo da propriedade, e na água do sistema público de abastecimento da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento SA (SANASA-Campinas/SP) utilizada no Laboratório de Pós- colheita da Feagri/Unicamp. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia recomendada pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005).

b. Alface

Foi considerada unidade amostral uma embalagem contendo uma unidade de alface. As análises realizadas seguiram metodologias propostas por Silva N. et al. (2007).

4.4.2.1. Preparo das amostras

Pesou-se 25g de amostra (pedaços das folhas de diversas partes da alface) e adicionou-se 225 ml de água peptonada 0,1%, homogeneizou-se manualmente e foram feitas diluições as quais foram inoculadas nos meios específicos para cada análise.

4.4.2.2. Coliformes Termotolerantes e E. Coli.

Utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos com séries de três tubos em cada diluição, tendo como meio presuntivo o caldo Lauril Sulfato Tryptose com incubação a 35°C em estufa bacteriológica da marca Robiatti modelo 216, durante 48h. Após leitura, os tubos positivos foram repicados para caldo EC para contagem de coliformes fecais, incubados a 44,5°C em banho-maria, por 24h. Os resultados foram tabelados como Número Mais Provável (NMP), com o intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

4.4.2.3. Bolores e Leveduras

A inoculação foi realizada por superfície em meio de cultura DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) através de plaqueamento e contagem por unidade formadora de colônia (UFC) g⁻¹.

4.4.2.4. Contagem Total de Aeróbios Mesófilos

Foi realizada inoculação por profundidade em meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) através de plaqueamento e contagem por UFC g⁻¹.

4.4.2.5. Análise de *Salmonella spp.*

Realizou-se o método de pré-enriquecimento adicionando-se 25 g da amostra em 225 mL de água peptonada e incubou-se em estufa a 35°C durante 24 h, posteriormente transferiu-se 1 mL da peptona para os tubos contendo Caldo de Tetrionato e Caldo de Selenito Cistina, incubando-se a 35°C durante 24h. Posteriormente foi realizado o método de plaqueamento diferencial, estriando alçadas do caldo Tetrionato e Selenito Cistina em placas de Ágar Entérico de Hectoen, Ágar Bismuto Sulfito, Ágar Xilose Lisina, Ágar Verde Brilhante e Ágar Salmonella – Shigella, incubou-se as placas invertidas a 35°C por 24h para verificar o crescimento de colônias típicas de *Salmonella spp.* O teste bioquímico foi realizado para a confirmação definitiva, removendo-se uma porção da massa de célula e inoculando em tubos contendo Ágar Tríplice de Açúcar Ferro, Ágar Lisina Ferro, Caldo Malonato e Uréia, e incubando-se em estufa a 35°C por 24h.

4.4.3 Determinação indireta de clorofila (Índice SPAD – Soil Plant Analysis Development)

Foi realizada leitura em clorofilômetro Minolta Chlorophyll meter, modelo RS-32 (Spectrum Technologies Inc. SPAD 502DL Plus, precisão ± 1 SPAD, erro: $\pm 0,04$ SPAD/ $^{\circ}$ C) e os resultados expressos na unidade SPAD.

As leituras foram realizadas em 10 pontos das folhas intermediárias das amostras, após 3, 6 e 9 dias de armazenamento.

4.5. Delineamento Experimental

Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta, tendo como variáveis independentes a concentração de ozônio e temperatura da água de imersão, e como variáveis dependentes: a redução da carga microbiana, através de análises de *Salmonella ssp* e Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *E. Coli*, Bolores e Leveduras, Mesófilos além da manutenção dos teores de clorofila. O delineamento composto central rotacional (DDCR) para duas variáveis independentes e dois níveis (2^2) foi composto de quatro ensaios nas condições axiais ($\alpha = 2$) e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Foram realizados ainda tratamentos controle, utilizando apenas água refrigerada na mesma temperatura dos tratamentos com água ozonizada. As análises estatísticas foram feitas no programa *Statistica for Windows* versão 7.0 (2004). Os valores de estudo utilizados nesse trabalho estão apresentados na Tabela 3, a matriz do delineamento com os valores reais e codificados são apresentados na Tabela 4, os tratamentos controle e a temperatura utilizada são apresentados na Tabela 5.

Tabela 3. Valores utilizados no Delineamento Composto Rotacional para a avaliação da sanitização de alface ‘Vanda’ com água ozonizada.

Variáveis	Código	-1,41	-1	0	1	1,41
Concentração de ozônio (mg/L^{-1})	X1	0,1	0,2	0,5	0,8	0,9
Temperatura da solução ($^{\circ}$ C)	X2	5	8	15	22	25

Tabela 4. Matriz do delineamento experimental para a sanitização de alface ‘Vanda’, valores reais e codificados.

Tratamento	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X1	X2	Concentração (mg L ⁻¹)	Temperatura (°C)
T1	-1	-1	0,2	8
T2	1	-1	0,8	8
T3	-1	1	0,2	22
T4	1	1	0,8	22
T5	-1,41	0	0,1	15
T6	1,41	0	0,9	15
T7	0	-1,41	0,5	5
T8	0	1,41	0,5	25
T9*	0	0	0,5	15
T10*	0	0	0,5	15
T11*	0	0	0,5	15

*Pontos centrais.

Tabela 5. Valores utilizados no tratamento controle com água refrigerada.

Tratamento	Temperatura (°C)
C5	5
C8	8
C15	15
C22	22
C25	25

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise microbiológica da água

5.1.1. Água de irrigação

A caracterização microbiológica da água coletada do poço subterrâneo na propriedade, utilizada para irrigação, está apresentada na Tabela 6. Quando a referida análise foi realizada, a Portaria 518 de 25 de março de 2004 ainda estava em vigor.

A Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde, de 12 de dezembro de 2011, determina como padrão microbiológico de potabilidade para água destinada ao consumo humano, a ausência de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em 100 mL de amostra. Os resultados da análise da água de irrigação estão em desacordo com o preconizado pela legislação.

A presença de coliformes totais na água indica condições higiênicas insatisfatórias, porém não afirma que a contaminação é de origem fecal. Realiza-se então, a confirmação de coliformes termotolerantes e *E. coli*, principal representante de origem fecal desse grupo. Por ser patogênica ao homem, a poluição da água com essa enterobactéria representa risco à saúde.

Segundo a Resolução do CONAMA nº20, de 10 de junho de 1986, águas doces destinadas à irrigação de hortaliças não devem ser poluídas por excrementos humanos, ressaltando-se a necessidade de inspeções sanitárias periódicas.

Face ao exposto, observou-se que a água analisada neste estudo está imprópria para o fim que se destina, comprometendo a sanidade das alfaces irrigadas.

Tabela 6. Parâmetros microbiológicos da água utilizada para irrigação da planta de alface 'Vanda'.

Parâmetros	Análise da Amostra	V.M.P.*
Coliformes Totais	Presença	Ausência em 100 ml
Coliformes Termotolerantes / <i>E.coli</i>	Presença	Ausência em 100 ml

*Valor máximo permitido (Portaria 518 – Ministério da Saúde – 2004).

5.1.2. Água do sistema público de abastecimento coletada no laboratório da FEAGRI

A Tabela 7 apresenta os resultados microbiológicos da água proveniente do sistema público de abastecimento coletada no laboratório da FEAGRI.

Tabela 7. Parâmetros microbiológicos da água do Sistema de Abastecimento público de água (SANASA - Campinas/SP)

Parâmetros	Análise da Amostra	V.M.P.*
Coliformes Totais	Ausência	Ausência
Coliformes Termotolerantes / <i>E.coli</i>	Ausência	Ausência

*Valor máximo permitido (Portaria nº 518 – Ministério da Saúde – 2004).

De acordo com os resultados, verifica-se que a água fornecida pela SANASA-Campinas/SP estava isenta de contaminação, atendia aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004.

A SANASA informa que suas cinco estações de tratamento adotam o sistema convencional de obtenção de água potável (etapas básicas: coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação) a partir de águas superficiais dos rios Atibaia e Capivari, ambos pertencentes às Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Jundiaí e Capivari. Estes rios se classificam na “Classe 2” conforme Resolução nº 357 - CONAMA de 17/03/05, que estabelece parâmetros de qualidade para os corpos de água e dá as diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Durante o decorrer do ano de 2011 não foram constatadas contaminações ou variações de qualidade nos rios que comprometessem a qualidade da água produzida e distribuída em todos os parâmetros analisados, conforme previsto na Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde, de 12 de dezembro de 2011.

5.2. Contagem inicial de microorganismos presentes na alface tipo solta crespa ‘Vanda’.

A Tabela 8 apresenta os valores encontrados nas amostras de alface após a colheita, que não passaram por nenhuma etapa de lavagem, acondicionadas em embalagens plásticas e transportadas ao LTPC.

Tabela 8. Contagem microbiológica inicial na alface tipo solta crespa 'Vanda'.

Análise	Contagem
Bolores e Leveduras (BL) ^a	9,5x10 ⁴
Mesófilos (Me) ^a	8,1x10 ⁵
Coliformes Totais (CT) ^b	>1,1x10 ³
Coliformes termotolerante, <i>E. coli</i> (ECT) ^b	>1,1x10 ³
<i>Salmonella</i> (Sa)	Presença (P)

^a Valor expresso em Unidade formadora de colônia g⁻¹

^b Valor expresso em Número mais provável g⁻¹

Dentre os microrganismos presentes na alface, os aeróbios mesófilos apresentaram maior valor de UFC seguidos de bolores e leveduras. A contagem dos coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* foi maior do que 1,1x10³. Detectou-se ainda, a presença de *Salmonella*.

A Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) estabelece padrões microbiológicos para hortaliças, legumes e similares – frescos *in natura*, a contagem de até 10² UFC g⁻¹ de coliformes totais, fazendo parte desse grupo os termotolerantes a 45°C e a ausência de *Salmonella* em 25g de amostra. Portanto, a caracterização microbiológica da alface 'Vanda' está em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente.

Além da contaminação microbiológica proveniente da água de irrigação, esta também pode ser oriunda do solo, pelo fato da alface estar em contato direto com o mesmo, contagem de bolores e leveduras de até 10⁷ UFC g⁻¹, foram encontradas por Franco e Landgraf (2006). O resultado obtido neste estudo assemelha-se ao encontrado por esses autores.

Ressalta-se que o foco de contaminação das alfaces foi a água de irrigação que estava em desacordo com o preconizado pela legislação, esse resultado foi similar aos observados por Souto (2005) e Abreu et al. (2010) ao estudarem fontes de contaminação de hortaliças, nas quais identificaram que a água de irrigação foi o principal veículo de contaminação da alface. Segundo Guimarães et al. (2003), no município de Lavras/MG, afirmam que a água de irrigação foi responsável pela contaminação microbiológica de alface.

5.3. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa 'Vanda' após tratamento com água refrigerada.

A Tabela 9 apresenta os resultados da contagem microbiológica na alface usada como controle, tratada com água da rede pública de abastecimento em diferentes temperaturas.

Tabela 9. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa 'Vanda' tratada com água do sistema público de abastecimento em diferentes temperaturas.

Temperatura da água (°C)	Bolores e Leveduras (UFC g ⁻¹) ^a	Mesófilos (UFC g ⁻¹) ^a	Coliformes Totais (NMP g ⁻¹) ^b	Coliformes Termotolerantes e <i>E. Coli</i> (NMP g ⁻¹) ^b	<i>Salmonella</i>
5	4,1 x 10 ⁴	7,3 x 10 ⁴	4,6 x 10 ²	1,1x10 ³	Presença
8	5,3 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴	4,6 x 10 ²	1,1x10 ³	Presença
15	5,7 x 10 ⁴	7,5 x 10 ⁴	1,1x10 ³	1,1x10 ³	Presença
22	5,9 x 10 ⁴	3,8 x 10 ⁴	1,1x10 ³	1,1x10 ³	Presença
25	3,5 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁴	1,1x10 ³	1,1x10 ³	Presença

^a Unidade Formadora de Colônia g⁻¹

^b Valores expressos em Número Mais Provável g⁻¹

Em relação à contaminação inicial (Tabela 8), para o grupo dos bolores e leveduras, todos os tratamentos reduziram a contaminação desse grupo, com destaque para a temperatura de 25°C que promoveu a maior redução desses microrganismos passando de 9,5 x 10⁴ para 3,5 x 10⁴ UFC g⁻¹. Na contagem dos aeróbios mesófilos, observou-se que as maiores reduções ocorreram nas temperaturas de 22 e 25°C, sendo reduzida de 8,1x10⁵ para 3,8 e 3,9 x 10⁴ UFC g⁻¹. Para a análise de coliformes totais as maiores reduções ocorreram nas temperaturas de 5 e 8°C, passando de valores maiores que 1,1x10³ para 4,6 x 10² NMP g⁻¹. A contagem de coliformes termotolerantes e *E. Coli*, em todas as faixas térmicas estudadas, promoveu a redução de valores maiores que 1,10x10³ NMP g⁻¹ para 1,1x10³ NMP g⁻¹. Observou-se, ainda, que não houve alteração na contagem de *Salmonella*, demonstrando que a imersão da alface em água potável na faixa térmica estudada não elimina essa bactéria.

Os tratamentos utilizando unicamente água potável nas temperaturas de 5, 8, 15, 22 e 25°C auxiliaram na redução dos microrganismos patogênicos presentes na amostra, exceto *Salmonella*, porém não foram suficientes para adequar essa hortaliça aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001.

5.4. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa 'Vanda' nos tratamentos com água ozonizada.

A Tabela 10 apresenta os resultados microbiológicos na alface 'Vanda' após os tratamentos de sanitização com água ozonizada sob diferentes concentrações de ozônio e temperaturas.

Tabela 10. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa 'Vanda' sanitizada com água ozonizada por 1 minuto, em diferentes concentrações e temperaturas.

Tratamento	Contagem microbiológica				
	ECT NMP (g ⁻¹)	CT NMP (g ⁻¹)	BL UFC (g ⁻¹)	Me UFC (g ⁻¹)	Sa P ou A
T1 (0,2 mg L ⁻¹ e 8°C)	2,1 x 10 ¹	7,5 x 10 ¹	5,70 x 10 ³	4,50 x 10 ⁴	Presença
T2 (0,8 mg L ⁻¹ e 8°C)	<3	<3	2,30 x 10 ³	8,90 x 10 ³	Ausência
T3 (0,2 mg L ⁻¹ e 22°C)	2,1 x 10 ¹	3,8 x 10 ¹	4,10 x 10 ³	5,20 x 10 ⁴	Presença
T4 (0,8 mg L ⁻¹ e 22°C)	<3	<3	2,70 x 10 ³	8,40 x 10 ³	Ausência
T5 (0,1 mg L ⁻¹ e 15°C)	3,8 x 10 ¹	2,1 x 10 ²	6,70 x 10 ³	6,30 x 10 ⁴	Presença
T6 (0,9 mg L ⁻¹ e 15°C)	<3	<3	1,70 x 10 ³	7,30 x 10 ³	Ausência
T7 (0,5 mg L ⁻¹ e 5°C)	<3	<3	4,50 x 10 ³	2,70 x 10 ⁴	Ausência
T8 (0,5 mg L ⁻¹ e 25°C)	<3	<3	3,30 x 10 ³	3,10 x 10 ⁴	Ausência
T9 (0,5 mg L ⁻¹ e 15°C)	<3	<3	2,90 x 10 ³	2,50 x 10 ⁴	Ausência
T10 (0,5 mg L ⁻¹ e 15°C)	<3	<3	2,40 x 10 ³	2,30 x 10 ⁴	Ausência
T11 (0,5 mg L ⁻¹ e 15°C)	<3	<3	2,10 x 10 ³	2,10 x 10 ⁴	Ausência

Os tratamentos resultaram na redução de UFC g⁻¹ de bolores e leveduras variando de 1,7 x 10³ para 6,7x10³, para aeróbios mesófilos de 7,3 x 10³ para 6,3 x 10⁴; para coliformes termotolerantes e *E. coli* de valores menores que 3 para 3,8x10¹ NMP g⁻¹ e, para coliformes totais de valores menores que 3 para 2,1 x 10² NMP g⁻¹. Com exceção dos tratamentos T1, T3 e T5, todos os demais foram eficazes na eliminação da bactéria *Salmonella*. Exceto para *Salmonella* nos tratamentos com água ozonizada T1, T3, e T5 todos os demais apresentaram contagem inferior aos tratamentos controle a diferentes temperaturas (Tabela 9). Portanto, as concentrações de 0,1 e 0,2 mg de ozônio por litro de água não foram efetivas para o controle de *Samonella*.

Desse modo, as concentrações de ozônio 0,5; 0,8 e 0,9 mg L⁻¹ foram eficazes para a redução dos microrganismos aos níveis preconizados pela legislação vigente (*Salmonella sp* ausente em amostra de 25g).

Esses resultados ressaltam a necessidade de utilizar um agente sanizante para a redução dos microrganismos aos níveis recomendados pela legislação.

5.5. Contagem microbiológica na alface tipo solta crespa 'Vanda' sanitizada com água ozonizada, durante o armazenamento a 5°C.

A Tabela 11 apresenta os resultados da contagem microbiológica na alface nos tratamentos com água ozonizada por 1 minuto, no 3º, 6º e 9º dia de armazenamento a 5°C.

Tabela 11. Contagem microbiológica de alfaces tipo solta crespa 'Vanda' nos tratamentos com água ozonizada por 1 minuto, nos dias 3, 6 e 9 de armazenamento a 5°C.

Tratamento	Armazenagem (dias)	Contagem microbiológica			
		ECT	CT	BL	Me
		NMP (g ⁻¹)	NMP (g ⁻¹)	UFC (g ⁻¹)	UFC (g ⁻¹)
T1 (0,2 mg L ⁻¹ e 8°C)	3	2,1 x 10 ¹	7,5 x 10 ¹	6,20 x 10 ³	5,50 x 10 ⁴
	6	2,1 x 10 ¹	7,5 x 10 ¹	4,30 x 10 ⁴	8,40 x 10 ⁵
	9	2,1 x 10 ¹	7,5 x 10 ¹	6,90 x 10 ⁵	2,50 x 10 ⁶
T2 (0,2mg L ⁻¹ e 8°C)	3	<3	<3	3,10 x 10 ³	4,00 x 10 ⁴
	6	<3	<3	3,60 x 10 ³	6,10 x 10 ⁴
	9	<3	<3	1,70 x 10 ⁴	2,10 x 10 ⁵
T3 (0,2 mg L ⁻¹ e 22°C)	3	2,1 x 10 ¹	3,8 x 10 ¹	5,60 x 10 ³	6,90 x 10 ⁴
	6	2,1 x 10 ¹	3,8 x 10 ¹	6,40 x 10 ⁴	2,80 x 10 ⁵
	9	2,1 x 10 ¹	3,8 x 10 ¹	2,80 x 10 ⁵	1,90 x 10 ⁶
T4 (0,8 mg L ⁻¹ e 22°C)	3	<3	<3	3,60 x 10 ³	4,70 x 10 ⁴
	6	<3	<3	6,20 x 10 ³	6,30 x 10 ⁵
	9	<3	<3	2,40 x 10 ⁴	8,90 x 10 ⁵
T5 (0,1 mg L ⁻¹ e 15°C)	3	3,8 x 10 ¹	2,1 x 10 ²	7,60 x 10 ³	7,10 x 10 ⁴
	6	3,8 x 10 ¹	2,1 x 10 ²	8,10 x 10 ³	5,90 x 10 ⁵
	9	3,8 x 10 ¹	2,1 x 10 ²	5,50 x 10 ⁴	7,10 x 10 ⁶
T6 (0,9 mg L ⁻¹ e 15°C)	3	<3	<3	2,70 x 10 ³	3,80 x 10 ⁴
	6	<3	<3	5,20 x 10 ³	5,30 x 10 ⁴
	9	<3	<3	1,20 x 10 ⁴	2,50 x 10 ⁵
T7 (0,5 mg L ⁻¹ e 5°C)	3	<3	<3	5,80 x 10 ³	5,70 x 10 ⁴
	6	<3	<3	6,50 x 10 ³	6,50 x 10 ⁴
	9	<3	<3	2,10 x 10 ⁴	7,40 x 10 ⁵
T8 (0,5 mg L ⁻¹ e 25°C)	3	<3	<3	6,30 x 10 ³	6,90 x 10 ⁴
	6	<3	<3	4,10 x 10 ⁴	1,50 x 10 ⁵
	9	<3	<3	7,20 x 10 ⁴	4,20 x 10 ⁵
T9 (0,5 mg L ⁻¹ e 15°C)	3	<3	<3	3,20 x 10 ³	7,10 x 10 ⁴
	6	<3	<3	4,20 x 10 ³	1,70 x 10 ⁵
	9	<3	<3	3,90 x 10 ⁴	3,50 x 10 ⁵
T10 (0,5 mg L ⁻¹ e 15°C)	3	<3	<3	3,00 x 10 ³	7,40 x 10 ⁴
	6	<3	<3	4,50 x 10 ³	1,80 x 10 ⁵
	9	<3	<3	3,2 x 10 ⁴	2,90 x 10 ⁵
T11 (0,5 mg L ⁻¹ e 15°C)	3	<3	<3	3,30 x 10 ³	7,80 x 10 ⁴
	6	<3	<3	4,70 x 10 ³	2,60 x 10 ⁵
	9	<3	<3	2,30 x 10 ⁴	3,10 x 10 ⁵

Observou-se que em todos os tratamentos a concentração inicial de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. Coli* permaneceu a mesma durante todo o período de avaliação. Guth (2000), verificou tendência similar ao realizarem estudos com *E. coli*, notando que o ozônio foi capaz de penetrar na membrana celular e reagir com substâncias citoplasmáticas, que possivelmente diminuiu sua capacidade multiplicadora.

Ao final do armazenamento, os tratamentos T1, T3 e T5 apresentaram as maiores contagens para os microrganismos deteriorantes, sendo superiores a 10^5 UFC g⁻¹. Embora a legislação não estabeleça padrões microbiológicos para microrganismos mesófilos e bolores e leveduras, essa determinação reflete nas condições higiênicas dos produtos, como as condições de produção, a situação da matéria-prima, do ambiente e do armazenamento (SILVA et. al., 2001). Vitti (2004) afirma que contagens acima de 10^5 UFC g⁻¹ são indesejáveis devido o risco potencial de perdas das características organolépticas e comprometimento da qualidade do alimento.

Em todos os tratamentos com água ozonizada, a redução de coliformes termotolerantes e *E. coli* foi maior do que com os tratamentos controle, tanto nos tratamentos com água ozonizada quanto nos tratamentos controle a contagem microbiológica de coliformes termotolerantes e *E. coli* permaneceu a mesma até o último dia de análise.

Os tratamentos com água ozonizada reduziram até 1,48 ciclos logarítmicos na contagem de coliformes termotolerantes e *E.coli*.

O comportamento dos coliformes totais foi o mesmo observado nos coliformes termotolerante e *E. coli*, não havendo crescimento desse microrganismo até o final do armazenamento.

Os tratamentos com água ozonizada apresentaram melhor desempenho na redução de bolores e leveduras em comparação aos tratamentos controle.

Nos tratamentos com água ozonizada verificaram-se as maiores reduções na população de mesófilos. Apesar da temperatura ótima de crescimento de mesófilos ser de 20 a 30°C, observou-se que para os tratamentos com água ozonizada houve aumento na contagem dos mesófilos durante o armazenamento a 5°C (ANTONIOLLI, 2005).

5.6. Índice de clorofila.

Os resultados experimentais obtidos na determinação do índice de clorofila em alface tipo solta crespa 'Vanda' são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Índice de clorofila em alface tipo solta crespa 'Vanda' nos tratamentos com água ozonizada durante os dias de armazenamento a 5°C.

Tratamento	Clorofila (SPAD)			
	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9
T1 (0,2mg L ⁻¹ e 8°C)	20,4	18,1	17,6	16,31
T2 (0,8mg L ⁻¹ e 8°C)	16,5	14,3	13,5	12,9
T3 (0,2mg L ⁻¹ e 22°C)	21,2	19,3	17,5	16,4
T4 (0,8mg L ⁻¹ e 22°C)	23,3	20,3	18,9	16,3
T5 (0,1mg L ⁻¹ e 15°C)	22,4	20,5	19,6	17,5
T6 (0,9 mg L ⁻¹ e 15°C)	22,1	20,3	19,1	13,5
T7 (0,5mg L ⁻¹ e 5°C)	21,7	19,6	17,6	14,0
T8 (0,5mg L ⁻¹ e 25°C)	18,5	17,3	15,4	13,4
T9 (0,5mg L ⁻¹ e 15°C)	23,4	20,6	16,3	11,7
T10 (0,5mg L ⁻¹ e 15°C)	19,1	18,2	15,7	12,6
T11 (0,5mg L ⁻¹ e 15°C)	19,3	16,7	15,4	13,7

Os valores de clorofila no dia 0 oscilaram entre 16,5 e 23,4. Segundo Uddling et al. (2007), a distribuição da clorofila na superfície da folha é desuniforme, principalmente em folhas bem esverdeadas, o que pode resultar a uma subestimação dos valores do SPAD em folhas com altos teores de clorofila.

O tratamento T2 mostrou o melhor desempenho na manutenção de clorofila, com redução de 21%, porém, o tratamento T9 apresentou perda de 50%.

Embora ocorra perda de clorofila, atestada pela medição com equipamento SPAD-502, mesmo em ambiente refrigerado e com ausência de luz, condições estas que tendem a favorecer a preservação da clorofila (BAREA e REINEHR, 2006; PARK et al., 1999), não é possível afirmar que o valor porcentual de perda medida objetivamente seja perceptível pelo consumidor sem uma avaliação sensorial.

5.7. Análise estatística.

5.7.1. Efeito dos tratamentos com água ozonizada na redução microbiológica

As tabelas a seguir apresentam os resultados do coeficiente de regressão para as respostas bolores e leveduras, mesófilos e clorofila. Não foi possível realizar a análise para utilizar os dados de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E.coli*, pois os resultados são estimados em números mais prováveis, não sendo um valor mensurável. Por ser um processo que envolve muita manipulação e utilizar material biológico, optou-se por utilizar o intervalo de 90% de confiança.

Analisando-se os coeficientes de regressão para a resposta Bolores e Leveduras nos dias 0, 3, 6 e 9 (Tabela 13), observa-se que somente os termos do Dia 0 foram estatisticamente significativos, sendo possível realizar a Análise de Variância (Tabela 14). A partir desses resultados, construiu-se a superfície de resposta (Figura 4A) e a curva de contorno (Figura 4B) e obteve-se o modelo.

A Equação 2 apresenta o modelo completo obtido para a resposta Bolores e Leveduras no Dia 0.

$$Y=2466,67 -1483,88x_1 + 779,17x_1^2 - 362,13x_2 + 629,17x_2^2 +500 x_1x_2 \quad (2)$$

O valor da interação x_1x_2 no Dia 0 não foi estatisticamente significativo, mas como esse valor está próximo da faixa do p-valor, resolveu-se considerá-lo para fazer a ANOVA.

Nas demais respostas Dia 3, Dia 6 e Dia 9, percebeu-se que as variáveis temperatura e concentração de água ozonizada não apresentam influência sobre essas respostas, visto que o erro padrão foi muito alto, indicando que esse resultado não representa os dados experimentais obtidos.

Tabela 13. Coeficiente de regressão para a resposta Bolores e Leveduras durante 9 dias de armazenamento.

Dia 0				
Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	2466,67	288,35	8,554	0,000360
X ₁ (L)	-1483,88	176,58	-8,40330	0,000391
X ₁ (Q)	779,17	210,17	3,70720	0,013895
X ₂ (L)	-362,13	176,58	-2,05077	0,095549
X ₂ (Q)	629,17	210,17	2,99352	0,030324
X ₁ X ₂	500,00	249,72	2,00219	0,101655
Dia 3				
Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	3166,67	403,9633	7,83900	0,000542
X ₁ (L)	-1503,71	247,3760	-6,07862	0,001742
X ₁ (Q)	747,92	294,4363	2,54016	0,051883
X ₂ (L)	75,89	247,3760	0,30677	0,771381
X ₂ (Q)	1197,92	294,4363	4,06851	0,009648
X ₁ X ₂	275,00	349,8425	0,78607	0,467427
Dia 6				
Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	4466,7	10283,39	0,43436	0,682134
X ₁ (L)	-12787,7	6297,26	-2,03067	0,098028
X ₁ (Q)	4654,2	7495,24	0,62095	0,561841
X ₂ (L)	9173,8	6297,26	1,45679	0,204957
X ₂ (Q)	13204,2	7495,24	1,76167	0,138425
X ₁ X ₂	-4850,0	8905,68	-0,54460	0,609430
Dia 9				
Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	31333	119189,1	0,26289	0,803126
X ₁ (L)	-123726	72988,1	-1,69516	0,150815
X ₁ (Q)	54271	86873,3	0,62471	0,559557
X ₂ (L)	-41359	72988,1	-0,56666	0,595436
X ₂ (Q)	60771	86873,3	0,69953	0,515416
X ₁ X ₂	104250	103220,8	1,00997	0,358859

Tabela 14. Análise de variância para a resposta Bolores e Leveduras Dia 0.

ANOVA – Bolores e Leveduras Dia 0					
Fonte de variação	SQ	Gl	QM	F _{cal}	p-valor
Regressão	24081822,5	5	4816364,5		
Resíduos	1247268,4	5	249453,7	19,31	<0,0001
Total	25329091	10	2532909,1		

% Variação explicada (R²) =95,08 F_{0,01;5;5} = 10,97

A relação do F calculado com o F tabelado para a regressão foi de 8,34 com um coeficiente de 95,08% explicando o modelo, a ANOVA (Tabela 14) foi validada.

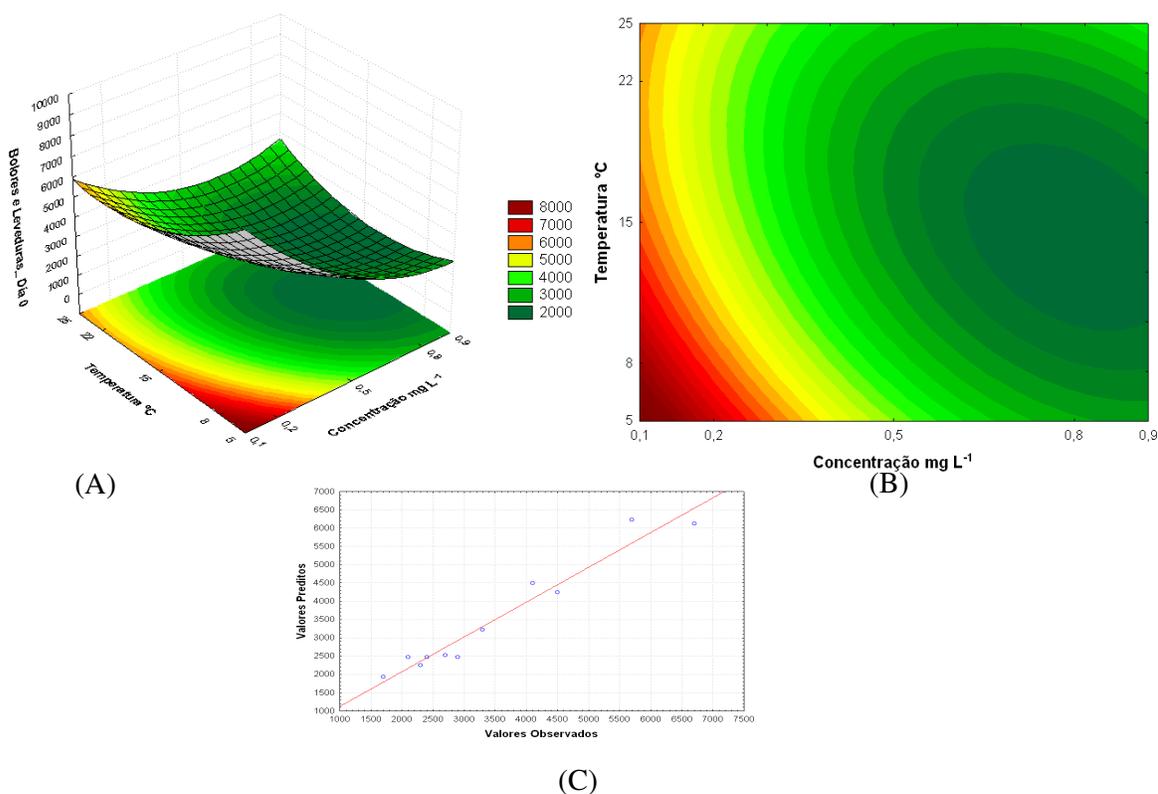


Figura 4. Superfície de resposta (A), curva de contorno (B) e valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo (C) para a resposta Bolores e Leveduras Dia 0.

Através na análise da superfície de resposta (Figura 4), verifica-se que para a redução da contagem de Bolores e Leveduras Dia 0 deve-se trabalhar em concentrações de 0,8 a 0,9 mg de ozônio e com faixa de temperatura de 8 a 20°C. Para realizar a validação

dos experimentos, sugere-se fixar a faixa de trabalho os valores mínimo de ambos os parâmetros, 0,8 mg e 20°C.

A Tabela 15 apresenta os valores encontrados para o coeficiente de regressão para a resposta Mesófilos nos dias 0, 3, 6 e 9.

Tabela 15. Coeficiente de regressão para a resposta Mesófilos durante 9 dias de armazenamento.

Dia 0*				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	25000,0	1414,729	17,6712	<0,0001
X ₁ (L)	-19809,0	1190,672	-16,6368	<0,0001
X ₁ (Q)	4575,0	1354,500	3,3776	0,0096
Dia 3				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	74333,3	2712,717	27,40180	0,000001
X ₁ (L)	-10458,6	1661,193	-6,29585	0,001487
X ₁ (Q)	-11416,7	1977,215	-5,77411	0,002191
X ₂ (L)	4746,3	1661,193	2,85718	0,035524
X ₂ (Q)	-7166,7	1977,215	-3,62463	0,015146
X ₁ X ₂	-1750,0	2349,282	-0,74491	0,489837
Dia 6				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	203333,3	142313,9	1,428767	0,212446
X ₁ (L)	-54685,7	87149,1	-0,627495	0,557873
X ₁ (Q)	19083,3	103728,2	0,183974	0,861262
X ₂ (L)	16151,0	87149,1	0,185326	0,860256
X ₂ (Q)	44833,3	103728,2	0,432219	0,683587
X ₁ X ₂	282250,0	123247,4	2,290108	0,070640
Dia 9				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	316667	646510,2	0,48981	0,645002
X ₁ (L)	-1623420	395905,0	-4,10053	0,009350
X ₁ (Q)	1491042	471221,2	3,16421	0,024977
X ₂ (L)	-46569	395905,0	-0,11763	0,910943
X ₂ (Q)	-56458	471221,2	-0,11981	0,909297
X ₁ X ₂	320000	559894,2	0,57154	0,592368

*Valores reparametrizados

Para a resposta Mesófilos Dia 0, foi feita a reparametrização dos resultados e apenas os valores da variável concentração tiveram influência na resposta. Para as demais, não houve nenhum parâmetro estatisticamente significativo. A tabela da ANOVA (Tabela

16) apresenta uma variação explicada de 97%. Assim, foi possível construir a superfície de resposta (Figura 5 A) e a curva de contorno (Figura 5 B).

Assim como para a resposta de Bolores e Leveduras nos Dias 3, 6 e 9 percebeu-se que as variáveis temperatura e concentração de água ozonizada não apresentam influência nas respostas de Mesófilos, haja visto que o erro padrão foi muito alto, indicando que esse resultado não representa os dados experimentais obtidos.

Analisando os coeficientes de regressão (Tabela 15) para a resposta Mesófilos dia 0 e ignorando os fatores não significativos ($p < 0,10$) obtem-se o seguinte modelo:

$$Y = 25000 - 19809 x_1 + 4575 x_1^2 \quad (3)$$

Tabela 16. Análise de variância para a resposta Mesófilos Dia 0.

ANOVA – Mesófilos Dia 0					
Fonte de variação	SQ	Gl	QM	F _{cal}	p-valor
Regressão	3268549099,5	2	1634274549,8	144,10	<0,0001
Resíduos	90732718,7	8	11341589,8		
Total	25329091	10			

% Variação explicada (R^2) = 97,30 $F_{0,01;2;8} = 8,65$

Na Figura 5 observou-se que a para a obtenção dos menores valores para a resposta Mesófilos Dia 0, deve-se trabalhar com concentração de 0,9 mg L⁻¹ de ozônio. Visto que a temperatura não foi estatisticamente significativa, a superfície revela que pode ser utilizada qualquer faixa. Em relação à temperatura, para nenhuma das respostas esta variável foi estatisticamente significativa dentro das condições estudadas. Portanto, para mesófilos qualquer uma das temperaturas pode ser usada na sanitização, visando economizar energia, sugere-se trabalhar com a temperatura de 25°C.

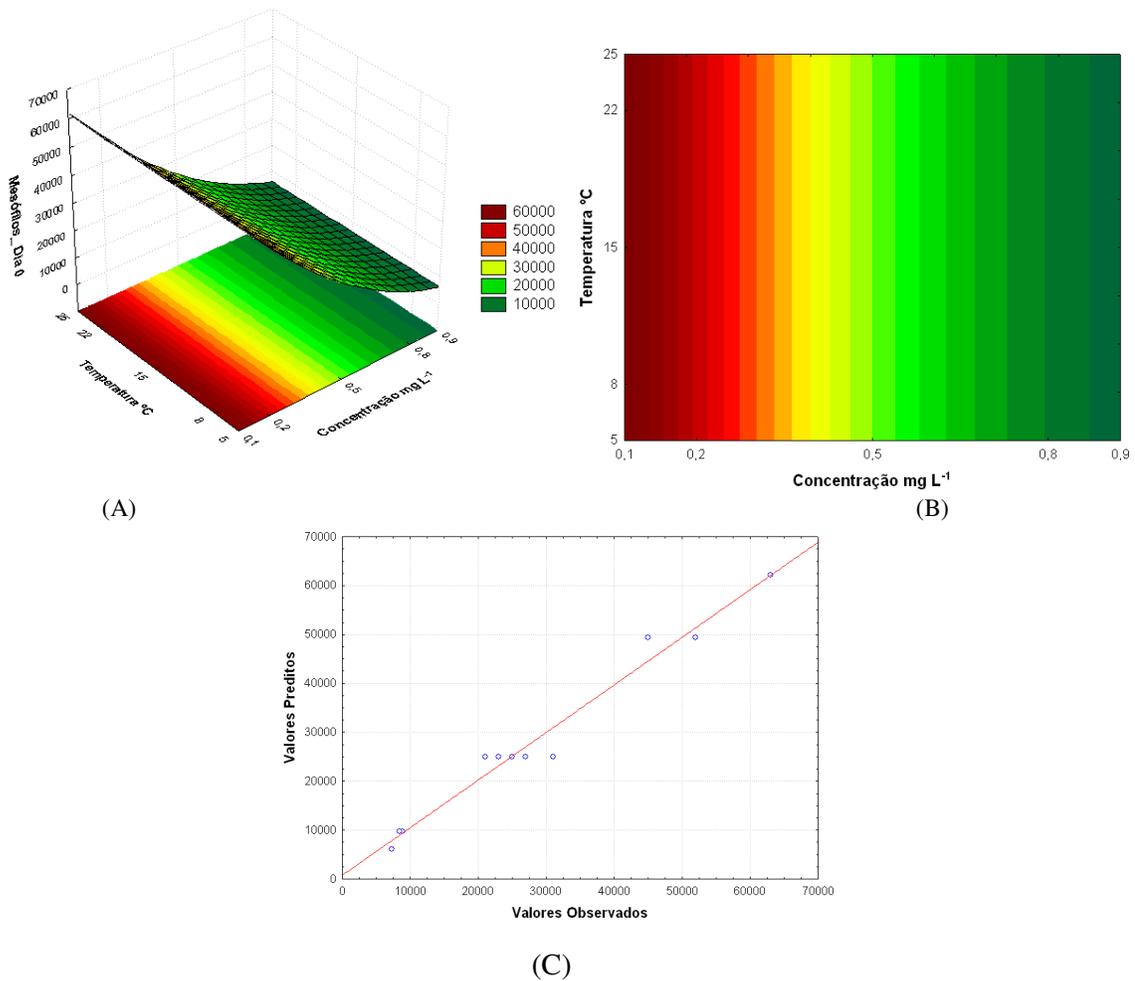


Figura 5. Superfície de resposta (A), curva de contorno (B) e valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo (C) para a resposta Mesófilos Dia 0.

5.7.2. Efeito dos tratamentos com água ozonizada na redução de clorofila

De acordo com os dados apresentados na Tabela 17, verifica-se que nenhum dos termos foi estatisticamente significativo, em muitos casos os erros padrões foram maiores que os próprios coeficientes do modelo. Dessa forma, não é adequado tirar o modelo para gerar a superfície de resposta, porque os valores dos resultados estão muito próximos, implicando que os parâmetros concentração de ozônio e a temperatura da água não têm influência no teor de clorofila.

Tabela 17. Coeficiente de regressão para a resposta Clorofila durante 9 dias de armazenamento.

Dia 0				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	22,65667	2,393194	9,467123	0,000222
X ₁ (L)	-0,62803	1,465526	-0,428538	0,686094
X ₁ (Q)	-0,58458	1,744325	-0,335134	0,751127
X ₂ (L)	0,03431	1,465526	0,023415	0,982225
X ₂ (Q)	-1,65958	1,744325	-0,951419	0,385083
X ₁ X ₂	0,80000	2,072567	0,385995	0,715379
Dia 3				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	20,83667	2,494211	8,354011	0,000402
X ₁ (L)	-0,01036	1,527386	-0,006780	0,994853
X ₁ (Q)	-0,38708	1,817953	-0,212923	0,839796
X ₂ (L)	0,86841	1,527386	0,568562	0,594238
X ₂ (Q)	-1,36208	1,817953	-0,749240	0,487443
X ₁ X ₂	1,95000	2,160050	0,902757	0,408039
Dia 6				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	15,80000	0,885870	17,83558	0,000010
X ₁ (L)	-0,41922	0,542482	-0,77278	0,474577
X ₁ (Q)	1,51583	0,645683	2,34764	0,065752
X ₂ (L)	0,26692	0,542482	0,49204	0,643529
X ₂ (Q)	0,09083	0,645683	0,14068	0,893616
X ₁ X ₂	1,36167	0,767186	1,77489	0,136089
Dia 9				
Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	12,36889	0,784743	15,76171	0,000019
X ₁ (L)	-1,12616	0,480555	-2,34345	0,066096
X ₁ (Q)	1,80431	0,571975	3,15452	0,025250
X ₂ (L)	0,34241	0,480555	0,71253	0,507997
X ₂ (Q)	0,90431	0,571975	1,58102	0,174714
X ₁ X ₂	0,84500	0,679607	1,24337	0,268853

6. CONCLUSÕES

A água ozonizada nas concentrações de 0,5, 0,8 e 0,9 mg L⁻¹ no tempo de contato de um minuto foi eficiente na eliminação de *E. coli* e *Salmonella*.

Os tratamentos com água ozonizada não tiveram influência significativa na degradação da clorofila.

A sanitização de alface com água ozonizada nas concentrações de 0,5; 0,8 e 0,9 mg L⁻¹, por um minuto pode ser realizada à temperatura de 25°C.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, I. M. O. et. al. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, vol.30, suppl.1, pp. 108-118, 2010.

ALVES, S.L; da C.; NEVES, M. C.P.; COSTA, J.R. Avaliação da contaminação microbiológica de alface orgânica e convencional em diferentes pontos de comercialização. **Comunicado técnico, 105.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 4p.

AMARAL, L.A. et al. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública.** Jaboticabal, v. 37, n 4, p 510-514, 2003.

ANTONIOLLI, L. R. et. al. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi “Pérola” minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Brasília, v.27, n.1, p.157-160, abr.2005.

BACHELLI, M. L. B. **Sanitização para alface minimamente processada em comparação ao hipoclorito de sódio.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Campinas. 76 p.Campinas, SP.2010.

BAREA, J.L.; REINEHR, C.O. Decaimento da concentração de clorofila na alface armazenada sob refrigeração e em presença de luz. **XXI Congresso de Iniciação Científica em Tecnológica em Engenharia.** Passo Fundo, Rio Grande do Sul. 2006

BARROS NETO, B. DE, SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** Campinas: UNICAMP, 1995,299 p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 401p, Campinas: UNICAMP, 2002.

BASSANI, L. **Desinfecção de efluente sanitário por ozônio: parâmetros operacionais e avaliação econômica.** Dissertação (Mestrado). Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection,** Des Moines, v. 59, n. 2, p. 204-216, 1996

BEUCHAT, L.R. **Standardization of methods to determine the efficacy of disinfectants for raw fruits and vegetables.** In: TUIJTELAARS,et al, (eds) Food Microbiology and Food safety into the next millenium. Proceedings of 17th International Conference of International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Vindhoven, The Netherlands, 13-17, September,1999, p. 785-786, 1999.

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

BOMFIM, M. V. J. et al. Avaliação físicoquímica e microbiológica da água de abastecimento do laboratório de bromatologia da UERJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 152, p. 99-103, jun. 2007.

BONILHA, P.R.M. **Microrganismos indicadores de contaminação fecal e enteropatogênicas em hortaliças e suas águas de irrigação**. 81p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 1986.

BOX, G.E.P.; HUNTER, H.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley Co., 1978. p. 306-351, 501-539.

BRACKETT, R.E. Esporos e patógenos microbiológicos em frutas e vegetais minimamente processados. In: WILEY, R. C. (Ed.) **Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection**. New York: Nostrand Reinhold, 1994, p 269-312.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 518 de 25 de março de 2004. Dispõe sobre os Procedimentos e Responsabilidades Relativos ao Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade de água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011.

BRITO, C.S; ROSSI, D.A. Bolors e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja in natura industrializados e não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.21, n.1, p.133-140. jan./abr., 2005

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

CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo). **Classificação de alface**. Disponível em <<http://www.ceagesp.gov.br>> (dez, 2010).

CHITARRA, M.I.F., CHITARRA, A.B. *Pós-colheita de frutas e hortaliças*. São Paulo : UFLA., 1990. 320p.

CONSEA. **II Conferência Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional-Relatório Final**. Centro de convenções de Pernambuco- Olinda de 17 a 20 de março de 2004.

DA SILVA, L. M.; SANTANA, M. H. P.; BOODTS, J. F. C.; **Revista Química Nova**, 26, 880. 2003.

DI BERNARDO, L. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. Rio de Janeiro : ABES, v. 2, 1993.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.35, p.5-22, 2000.

ELBE, J.H.; FENNEMA, O. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Wisconsin - Madison, 2000.

EMBRAPA. Processamento de alface crespa. **Comunicado Técnico**. Brasília, DF. Dezembro, 2006.

FEACHEM, R.G.;et al. **Sanitation and Disease: Health aspects of excreta and wastewater management**. Washington (USA): John Wiley & Sons; 1983.

FILGUEIRA, F.A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p. : p. 40 - 135, 288 - 295.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce**. 2001.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Segurança Alimentar**. 2008

FONSECA, A. Uma salada de soluções. **Rev. Gôndola**, Belo Horizonte, v. 12, n 141, abril, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006.

FRANK, J.F.; K. TAKEUSHI.. Direct observation of Escherichia coli O157:H7 inactivation on lettuce leaf using confocal scanning laser microscopy. **Food Microbiology and Food safety into the next millenium. Proceedings of 17th International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH)**, Vindhoven, The Netherlands, 13-17, September, p. 795-797, 1999.

FURLANETO, L.; SANTINI, M. S.; VELASCO, F. A. S. Análise microbiológica de vegetais e hortaliças minimamente processados. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 131, p. 68 -71, mai., 2005

GELLI, D.S. et al. Condições higiênico sanitárias de hortaliças comercializadas no Estado de São Paulo, SP, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 39, p.37-43, 1979.

GOTO, R.; TIVELLI, S.W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: Condições Subtropicais**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1998. 319 p. p.15 -104, 137-159.

- 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.
- GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 351p., 1991.
- GUIMARÃES, A.G.; LEITE, C.C.; TEIXEIRA, L. D. S.; SANT.ANNA, M. E. B.; ASSIS, P.N. Detecção de *Salmonella* spp. Em alimentos e manipulados envolvidos em um surto de infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n. 1, p. 1 – 4, 2001.
- GUIMARÃES, A. M. et al. Frequência de enteroparasitas em amostra de alface (*Lactuca sativa*) comercializada em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 621-623, 2003.
- GUILLEN, A.C. **Estudo do ozônio em sistema de CIP (clean in place) para indústria vinícola**. Trabalho de Conclusão de Graduação. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.
- GUTH B. E. C. **Enterotoxigenic *Escherichia coli* - An Overview Mem. Inst. Oswaldo Cruz** vol.95 s.1: 95-97. Rio de Janeiro. 2000.
- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in food industry. **Lebensm-Wiss. u.-Technol**, v. 37, p. 453-460, 2004.
- HEATON, J.W., MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed food and senescent tissues. **Trends Food Sci. Technol.**, v.7, p. 8-15, 1996.
- HENS, G.P; SUINAGA, F. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Comunicado técnico**. Embrapa. Brasília, DF. 2009.
- IBGE. **Censo Agropecuário: Brasil, 2006**. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em Dez 2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia dos Alimentos**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 711p., 2005.
- JESUS, S. V.; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazônica**, vol. 38 (4), p. 815-818. 2008
- KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E; KIM, J.-G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **J. Food Sci.**, v.66, n.9, p. 1241-1252, 2001.
- KIM, J.G.; YOUSEF, E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071- 1087, 1999.

- 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, 2001.
- KUNZ, A. Proc. 5th **Braz. Symp. Chem.** Lignins Other Wood Compon. Curitiba- Pr 1997, 92.
- LOTTO, M.C. **Avaliação da contaminação de alface (*Lactuca sativa*) por coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em sistemas de cultivo orgânico e convencional**. Dissertação (Mestrado). 76f. Universidade Federal de São Carlos. Araras, SP. 2008.
- MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**. Vol.14, n. 3, pg 219-224. Campinas-SP, Brasil, Dez 2001.
- MANSTEN, S. J.; DAVIES, S. H. R.; **Environ. Sci. Technol** 1994, 28, 184A
- MANOUSARIDIS, G. A. et al. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. **Food Microbiol.**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2005.
- MCKENZIE, K. S. et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, p. 807-820,1997.
- MEDINA, P. V. L. et al. Perda da qualidade da alface (*Lactuca sativa* L.) durante o armazenamento. I. Relações entre mudanças metabólicas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 29, n. 163, p. 259-267, 1982.
- MONTANHER, C. C; CORADIN, D. C.; FONTOURA DA SILVA, S. E. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes self-service por quilo, da Cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estud. Biol.** 2007 jan/mar;29(66):63-71
- MONTGOMERY, D. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.
- MYERS, D. **Surfaces, Interfaces and Colloids – Principles and Applications**: Wiley & Sons. 1999.
- NASCIMENTO, M.S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. 2002. 115f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara,2002.
- NASCIMENTO, A. R. et al. Incidência de *Escherichia coli* e *Salmonella* em alface (*Lactuca sativa*). **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.128, p.121-124, jan. /fev.2005.
- OHSE, S. **Rendimento, composição centesimal e teores de nitrato e vitamina c em alface sob hidroponia**. 1999. 103f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba.

- OKURA, M. H.; MARIANO, A. M. S. E.; TEIXEIRA, A. N. S. Eficiência de sanitizantes no tratamento “minimamente processado” de alface cultivada e meio hidropônico. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20 n. 142, p. 105 – 113, jul., 2006.
- OLIVEIRA, C. A.; GERMANO, P. M. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo–SP, Brasil – II- Pesquisa de protozoários intestinais. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.26, n.5, p.332- 335, 1992
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Directrices sanitárias sobre el uso de águas residuales em agricultura e aquicultura**. Genebra:OMS, 1989.
- PACHECO, M. S. R. et al. Condições higiênicos–sanitárias de verduras e legumes comercializadas no Ceagesp de Sorocaba–SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n.101, p.50-51, 2002.
- PAULA, V.; KATO, M. T.; FLORÊNCIO, L. Qualidade de água usada na agricultura urbana na Cidade do Recife. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.123-127, 2005. Campina Grande, PB.
- PARK, K.W.; KANG, H. M.; YANG, E. M.; JUNG, J.C. Effects of filme package and storage temperature on the quality of parsley in modified atmosphere storage. **Acta Horticulturae**, n. 483, p. 291-298, 1999.
- PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Hall Person. 624p., 2004.
- PEREIRA, J. L.; MIYA, N.; MAISTRO, L. C. Importância da enumeração rápida das bactérias patogênicas em vegetais folhosos minimamente processados: uma análise. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89,p. 15 – 21, out 2001.
- PEZZI, E. **O uso do ozônio como sanitizante em pós-colheita de produtos agrícolas**. Monografia (Especialização em Fitossanidade). Faculdade de Agronomia. Universidade do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- PRESTES, E.B. **Avaliação da eficiência do ozônio com sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas**. 135f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 455 p. 2005.
- RIGOLIN-SÁ; PEREIRA, K.C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de hortaliças e da água utilizada em hortas na cidade de Passos – MG. **Revista Hispeci & Lema**. Vol. 8, Bebedouro, p 22-23. 2005.
- RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª Ed. Campinas, SP: Ed. Cáritas, 2009. 365p.
- RODRIGUEZ, M.N.R. et al. Estimación de La concentración de nitrogenio y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. **Revista Terra**, v.16, n.2, p.135-141, 1998.

ROSA, C.C.B; MARTINS, M.L.L. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de hortas comunitárias de Campos dos Goytacases – RJ. **In: Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 21, 2001. Londrina:SBM, 2001. p. 9404

SÁ, L. L. C. et. al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em duas áreas contempladas com intervenções de saneamento – Belém do Pará, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 2005; 14(3) : 171 - 180 Volume 14 - Nº 3 - jul/set de 2005.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. ‘Piraroxa’: Cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p. 158-159, 2005b.

SILOCHI, R. M. **Boas Práticas de Comercialização no Varejo de Frutas e Hortaliças na Rede Supermercadista: Estudo de Casos**. 2007. 155f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas.

SILVA, V. F. **Modificações bioquímicas e aparentes do processo de senescência em alface (*Lactuca sativa* L.) durante o armazenamento**. Tese (Mestrado)Viçosa : UFV, 1980. 39 p.

SILVA, J.V. et al. Monitoramento da qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal” fabricados artesanalmente. **Revista Indústria de Laticínios**, SP, v 34, p. 71-75, 2001.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167 – 173, mai. / ago., 2003.

SILVA, J. M. D. et al. **Métodos de determinação de clorofila em alface e cebolinha minimamente processadas**. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, Mexico. Vol. 8, n., 2, sin mes, pp. 53 – 59, 2007a.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo, 3a Ed., 552p., 2007b.

SILVA, S. R. P. et al. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 594 – 598, 2007c.

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.

SOPHER, C. D. et al. Studies on the use of ozone in production agriculture and food processing. **Proceedings of the International Ozone Association**. Chicago, 2002.

SOURCI, S.W.; FACHMANN, H.K. **Food composition and nutrition tables**. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers. 5.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995.

SOUTO, R. A. **Avaliação sanitária da água de irrigação e de alfaces (*Lactuca Sativa* L.) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba.** 70p. Dissertação (Mestrado). Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, UFPB, 70p. 2005.

Statistica for Windows versão 7.0. **Computer program manual.** Tulsa, Statsoft, OK, USA, 2004.

STREIT, N.M. et al. As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, São Paulo. v.35, n.3, p.748-755, 2005.

SUSLOW, T. **Postharvest chlorination – Basic properties and key points for effective disinfection.** University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 8003. 1997. 8p.

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

TANAKA, K. et al. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. **Planta Medica**, v.63, n.5, p.465-466, 1997.

TEIXEIRA, J. C. Desafios no controle de doenças de veiculação hídrica associadas ao tratamento e ao abastecimento de água para consumo humano. **VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.** Vitória-ES, Brasil, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 894 p., 2005.

UDDLING, J.; GELANG-ALFREDSSON, J.; PIIKKI, K.; PLEIJEL, H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. **Photosynth. Res.**, 91: 37-46

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Code of federal regulations:** title 9, poultry products; temperatures and chilling and freezing procedures. Washington, DC: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1997.

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

WEI, C.I.; COOK, D.L.; KIRK, J.R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technol.**, v. 39, p. 107-115, 1985.

WILLS, R. H. H.; LEE, T. H.; GRAHAM, D.; McGLASSON, W. B.; HALL, E. G. **Postharvest.** Westport: AVI, 1981. 163 p.