

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos alimentos  
Área de Bromatologia

**Irradiação de alface (*Lactuca sativa*, L.):  
aspectos microbiológicos e sensoriais**

Vanessa Provenzano Tsuhako

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:  
Prof. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo  
2005

**DEDALUS - Acervo - CQ**



30100010691

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

T882i Tsuhako, Vanessa Provenzano  
Irradiação de alface (*Lactuca sativa*, L.): aspectos  
microbiológicos e sensoriais / Vanessa Provenzano  
Tsuhako. -- São Paulo, 2005.  
71p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e  
Nutrição Experimental.

Orientador: Landgraf, Mariza

1. Microbiologia de alimentos 2. Vegetais : Ciência  
dos alimentos 3. Bromatologia 4. Listeria : Bacteriologia  
5. Alimento : Irradiação : Tecnologia I. T. II. Landgraf,  
Mariza, orientador.

664.07 CDD

Vanessa Provenzano Tshako

**Irradiação de alface (*Lactuca sativa*, L.):  
aspectos microbiológicos e sensoriais**

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

---

Profa. Assoc. Mariza Landgraf  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, 25/10 de \_\_\_\_\_.

## **Dedico**

Aos meus pais, Nelson e Sonia, pelo apoio e investimento.

À minha irmã Andressa, pela compreensão, solidariedade  
e amizade.

Às minhas tias Neide, Hilda e Heloísa por acreditarem no  
meu potencial e me apoiarem.

Ao Rodrigo pela paciência, incentivo e companheirismo.

## **Agradecimentos**

À Profª Assoc. Drª Mariza Landgraf, pela orientação, oportunidade de aprendizado e apoio.

Às Profª Maria Teresa Destro e Profª Bernadette Franco pela orientação e convívio.

Ao Profª Jorge Behrens pelo apoio e orientação.

À EMBRARAD, nas pessoas de Osnir, Beatriz, Eduardo e Dirceu Vizeu pelos processos de irradiação lá realizados.

À VEGETAIS PROCESSADOS LTDA., nas pessoas Lígia e Roberto Carrara pelo fornecimento das amostras de alfaces para os experimentos.

Às técnicas Kátia e Lúcia pela valiosa ajuda no laboratório.

Aos colegas Mônica, Patrícia Bettini, Gunnar, Cristina Garcia, Paulo, Juliana, Ângela, Katia Lima, Janine, Lina, Eb, Cristina Cruz, Cristiano, Vinícius, Hans, Patrícia Kary, Cíntia, Daniela, Gabriela, Alcina, Tatiana, Cecília, Antônio, Ricardo, Vanessa Vieira e Susana pelo companheirismo, troca de conhecimento, ajuda no laboratório, participação em testes e incentivo.

Ao Gunnar, Cecília e Sally pela carona providencial.

À Ângela (chefinha) por ter me treinado no laboratório.

Ao Paulo (Paulinho) pela estatística, explicações, troca de conhecimento e amizade.

À Cristina, Mônica, Susana, Janine, Patrícia Kary, Lina, Cecília, Eb e Cíntia pelo auxílio durante os experimentos.

Às secretárias do departamento de Ciências dos Alimentos e Nutrição Experimental: Mônica e Tânia.

À secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas nas pessoas de Elaine e Jorge.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Aos motoristas João e Castro pelo transporte sempre que necessário.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

À FAPESP pela pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que participaram das sessões de análises sensoriais ou que cooperaram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. MATERIAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
3.2.1. DETERMINAÇÃO DO VALOR $D_{10}$ PARA <i>L. monocytogenes</i> EM SALADA DE ALFACE COMPOSTA POR 4 VARIEDADES DO VEGETAL .....	21
3.2.1.1. Ensaio microbiológicos.....	21
3.2.1.1.1. Preparo da amostra.....	22
3.2.1.1.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. (Flowers <i>et al.</i> , 2001).....	23
3.2.1.1.3. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp. (Hitchins, 2003).....	24
3.2.1.2. Processamento mínimo .....	24
3.2.1.3. Preparo do inóculo .....	24
3.2.1.4. Contaminação da mistura de folhas de alface .....	25
3.2.1.5. Irradiação.....	25
3.2.1.6. Determinação da população de <i>L. monocytogenes</i> sobrevivente à irradiação (Kang e Fung, 1999 modificada).....	26
3.2.1.7. Cálculo do valor $D_{10}$ .....	26
3.2.2. VIDA DE PRATELEIRA .....	26
3.2.2.1. Análise sensorial .....	26
3.2.2.1.1. Análise estatística.....	28
3.2.2.2. Ensaio microbiológicos.....	27

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ALFACE ANTES E APÓS O PROCESSAMENTO MÍNIMO .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. DETERMINAÇÃO DO VALOR <math>D_{10}</math> PARA <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA</b>	
<b>IRRADIADA .....</b>	<b>32</b>
4.3.1. ANÁLISE SENSORIAL .....	33
4.3.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	35
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Avaliação microbiológica das amostras de alface pré e pós processamento mínimo realizado em laboratório (média de 3 experimentos) 30
- Tabela 2. Tabela 2. Comparação entre as médias obtidas no teste de aceitação para as amostras de alface Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa expostas a 1,5 kGy e as amostras testemunhas, mantidas a 10 °C, durante armazenamento, segundo teste de comparação de médias de Tukey 34



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de ficha de avaliação utilizada nas análises	27
Figura 2 Comportamento da população de <i>Listeria monocytogenes</i> inoculada em misturas de alface ( <i>Lactuca sativa</i> , L.) de quatro variedades diferentes (Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa) expostas à radiação ionizante	31
Figura 3. Comportamento das populações de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., bactérias láticas e microrganismos aeróbios psicrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Americana minimamente processada	36
Figura 4. Comportamento das populações de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., bactérias láticas e microrganismos aeróbios psicrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Crespa minimamente processada	37
Figura 5. Comportamento das populações de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., bactérias láticas e microrganismos aeróbios psicrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Lisa minimamente processada	37
Figura 6. Comportamento das populações de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., bactérias láticas e microrganismos aeróbios psicrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Crespa roxa minimamente processada	37
Figura 7. Aceitação da alface Americana minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 7 dias a 7°C.	40
Figura 8. Aceitação da alface Crespa minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 12 dias a 7°C.	40
Figura 9. Aceitação da alface Lisa minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 9 dias a 7°C.	41
Figura 10. Aceitação da alface Crespa roxa minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 9 dias a 7°C.	42

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cadastro de provadores	LIV
Anexo 2. Modelos matemáticos para a alface Americana testemunha e para a irradiada, obtida através de regressão linear	LVII
Anexo 3. Análise de variância da regressão linear para a alface Americana irradiada com 1,5 kGy	LIX
Anexo 4. Análise de variância da regressão para a alface Americana testemunha	LX
Anexo 5. Modelos matemáticos para a alface Crespa testemunha e para a irradiada, obtida através de regressão quadrática	LXI
Anexo 6. Análise de variância da regressão para a alface Crespa testemunha	LXII
Anexo 7. Análise de variância da regressão linear para a alface Crespa irradiada com 1,5 kGy	LXIII
Anexo 8. Modelos matemáticos para a alface Lisa testemunha e para a irradiada, obtida através de regressão linear	LXIV
Anexo 9. Análise de variância da regressão linear para a alface Lisa irradiada com 1,5 kGy	LXV
Anexo 10. Análise de variância da regressão para a alface Lisa testemunha	LXVI
Anexo 11. Modelos matemáticos para a alface Crespa roxa testemunha e para a irradiada, obtida através de regressão linear	LXVII
Anexo 12. Análise de variância da regressão linear para a alface Crespa roxa irradiada com 1,5 kGy	LXVIII
Anexo 13. Análise de variância da regressão para a alface Crespa roxa testemunha	LXIX

## Resumo

A demanda crescente por alimentos frescos tem incentivado o comércio de vegetais minimamente processados, que são disponibilizados já prontos para o consumo. No entanto, apesar de sanitizados, eles retêm a maioria de sua microbiota natural, inclusive patógenos. O armazenamento sob refrigeração favorece o crescimento de microrganismos psicrófilos, inclusive patogênicos como a *Listeria monocytogenes*. A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode representar um risco a gestantes e seus fetos, indivíduos com imunodeficiência adquirida e outras doenças que comprometam o sistema imunológico. Métodos alternativos de descontaminação que não empregam alta temperatura, como a irradiação, podem reduzir a população de microrganismos patogênicos e deteriorantes, sem causar alterações substanciais nas características sensoriais e físico-químicas do alimento. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar o efeito da radiação gama sobre *L. monocytogenes* inoculada artificialmente em uma mistura de 4 variedades de alface minimamente processada (Americana, Crespa, Lisa e Crespa Roxa); avaliar seu efeito nas variedades das folhas de alface, em separado, através do teste sensorial de aceitação e determinar a vida de prateleira do vegetal através do teste sensorial de aceitação e de acompanhamento microbiológico. População de *L. monocytogenes* (7 log UFC/g de alface) foi inoculada em mistura das 4 variedades de alface, já citadas, e expostas a 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 kGy sob refrigeração. Os valores  $D_{10}$  para a *L. monocytogenes* em salada de alface minimamente processada e irradiada variaram de 0,18 a 0,21 kGy. A análise sensorial e acompanhamento microbiológico indicam que a vida de prateleira das diferentes variedades, quando armazenadas a 10 °C, foi de 5 e 7 dias para a Americana irradiada e não irradiada, respectivamente; de 10 dias para as amostras não irradiada e irradiada da variedade Crespa; de 3 e 7 dias para a Lisa não irradiada e irradiada, respectivamente e de 4 dias e 5 dias para alface Crespa roxa não irradiada e irradiada, respectivamente. As amostras irradiadas foram mais estáveis microbiologicamente. O processo de irradiação mostrou ser factível para a melhora da inocuidade e qualidade desse alimento.

**Abstract**

The increasing demand for fresh foods have stimulated the marketing of minimally processed vegetables. However, these products maintain most of their natural microbiota even after being sanitized, including pathogenic microorganisms. Refrigerated storage allows the growth of psychrotrophic microorganisms and among them the pathogen *Listeria monocytogenes*. The ingestion of food contaminated with *L. monocytogenes* may represent a risk to pregnant women and their fetuses and to immunocompromised people. Non-thermal alternative processes for food preservation, such as irradiation, can reduce pathogenic and spoilage microorganism populations without impairing substantial changes in sensory, physical or chemical attributes. The aims of this research were to evaluate the effect of gamma radiation on *L. monocytogenes* artificially inoculated on minimally processed lettuce, to evaluate its effect on lettuce leaves through acceptance sensory test and to determine the irradiated vegetable shelf life through sensory and microbiological tests. A mixture of 4 types of lettuce (Iceberg, Boston, Loose-leaf and Red loose-leaf) were artificially inoculated with *L. monocytogenes* (7 log UFC/g lettuce) and then exposed to 0.3; 0.6; 0.9 and 1.2 kGy, under refrigeration. The D<sub>10</sub> values for *L. monocytogenes* varied from 0.18 to 0.21 kGy. Sensory and microbiological tests indicated that the shelf life of Iceberg lettuce stored at 7°C was 5 and 7 days for the irradiated and non-irradiated samples, respectively, and for the irradiated and non-irradiated Loose-leaf lettuce samples were 10 days. For the non-irradiated Boston sample, the shelf life was 3 days and for the irradiated 7 days. Red loose-leaf showed 5 and 4 days of shelf lives for the irradiated and non-irradiated, respectively. Irradiated samples presented better microbiological quality than non-irradiated ones. The irradiation is feasible process to improve quality and safety of lettuce leaves.

## 1. Introdução

Os alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, além de representarem uma ameaça à saúde pública, podem causar grandes perdas econômicas (Molins, 2001) por causa dos gastos com tratamento médico, recolhimento de alimentos devido à contaminação microbiana e o não preenchimento de padrões de qualidade exigidos, por exemplo, por países importadores.

No comércio internacional, em países de Ásia, a contaminação microbiana de produtos alimentícios acarreta rejeições de lotes de alimentos ou produtos alimentícios que podem chegar, em determinados casos, à total proibição da importação de alimentos (Merican, 1996).

Somente nos Estados Unidos, ocorrem por ano, aproximadamente, 76 milhões de casos de doenças com 323 mil hospitalizações devido à ingestão de alimentos contaminados, com um dispêndio de US\$ 6,7 bilhões em pacientes com infecções bacterianas (Mead *et al.*, 1999).

Hábitos relacionados com a cultura, como a ingestão de alimento cru, têm grande influência no número crescente de enfermidades transmitidas com alimentos (ETA) (Foerster, 1995). Entre os alimentos crus, o consumo de vegetais é uma importante via de ETA, pois é comum a prática da irrigação de hortas com águas contaminadas por matéria fecal e a adubação com dejetos humanos e de animais, sendo estas as principais causas da presença de patógenos em saladas prontas (Harvey e Gilmour, 1993; Nguyen-The e Carlin, 1994; Brackett, 1999; Francis *et al.*, 1999).

Mesmo que sejam adotadas boas práticas agrícolas (BPA), o risco de infecções ou intoxicações permanece durante o processamento, a distribuição e a preparação do alimento por causa da sua manipulação (Foerster, 1995; Francis *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, mudanças significativas nos hábitos alimentares da população urbana brasileira propiciaram um grande interesse no consumo de alimentos frescos de origem vegetal. Estas mudanças, associadas à busca pela praticidade no dia a dia, vêm provocando um crescimento contínuo do mercado de vegetais minimamente processados (Francis *et al.*, 1999; Rosa e Carvalho, 2000; Nascimento *et al.*, 2003).

Os vegetais minimamente processados surgiram para atender a serviços de bufê e de refeições rápidas (*fast foods*), mas evoluíram para a comercialização em varejo de vários países, incluindo o Brasil. Sua produção em alguns países da Europa, como por exemplo a França, aumentou de 400 toneladas em 1985 para 35 mil toneladas em 1989 (Nguyen-The e Carlin, 1994). No Brasil, o setor sofreu um crescimento de aproximadamente 200% do ano de 1995 a 1998, tendo neste último movimentado cerca de R\$ 450 milhões (Agriannual, 2000).

O processamento mínimo compreende operações que são realizadas antes do branqueamento e que mantém o tecido vivo (Rolle e Chism, 1987). Esse processamento apresenta as etapas de seleção, limpeza, desinfecção, descascamento, corte, remoção da água por centrifugação e o uso de aditivos para ajuste de pH (ácido cítrico/ascórbico), para o controle de oxidação (ácido ascórbico, bissulfito) e para modificar a textura (cálcio) (O'Connor-Shaw *et al.*, 1994, Rosa e Carvalho, 2000). Estes procedimentos não alteram suas características organolépticas e agregam valor, resultando em produtos com aparência semelhante ao do vegetal fresco e, possivelmente, com vida de prateleira mais longa. Além disso, é um produto que mantém sua qualidade nutritiva, é considerado inócuo e seu preparo é rápido (O'Connor-Shaw *et al.*, 1994).

A seleção e a limpeza estão relacionadas à retirada de matéria estranha, isto é, galhos, sujidades, terra, insetos de hortaliças e frutas. A lavagem geralmente é feita por imersão em solução de cloro 200 ppm por 10 minutos ou mais e posterior enxágüe com água tratada para eliminação de resíduos e de grande parte dos microrganismos (O'Connor-Shaw *et al.*, 1994). Todas as etapas do processamento mínimo exercem influência na microbiota dos vegetais. A desinfecção é considerada uma etapa de extrema importância no processamento mínimo, pois está diretamente relacionada à qualidade microbiológica do produto final (Allende *et al.*, 2004). Apesar disto, a presença de microrganismos deteriorantes e de patógenos em frutas e vegetais tem sido constatada e numerosos surtos de ETAs têm sido associados a estes alimentos (Beuchat, 1996a).

Além da deterioração microbiana, contribuem para diminuir a vida de prateleira de vegetais, as altas taxas de respiração, os cortes referentes ao processamento mínimo e as feridas presentes no tecido da folha, assim como a senescência e a perda de água. Estes processos fisiológicos aceleram a deterioração e, se comparada à alface inteira, a vida de prateleira de folhas de alfaces cortadas é substancialmente menor (King e Bolin, 1989; Nguyen-The e Carlin, 1994).

O risco de doenças causadas pela ingestão de saladas prontas depende do tipo de vegetal consumido, do seu local de produção, dos cuidados durante as etapas do processo, da virulência do agente e da resistência do consumidor ao agente infeccioso (Lin *et al.*, 1996).

A população de microrganismos presentes em vegetais minimamente processados varia entre 4 e 7 log UFC/g (King *et al.*, 1991). Predominam *Pseudomonas* sp, reconhecidamente produtoras de pectinases, e *Erwinia* sp. Estas cepas pectinolíticas podem causar a deterioração do vegetal minimamente processado durante o armazenamento (García-Gimeno e Zuzera-Cosano,

1997). Podem também estar presentes outros membros da família *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas que fazem parte da microbiota natural dos vegetais (Man e Jones, 1994). Como este tipo de produto é armazenado sob refrigeração, os microrganismos psicrófilos, inclusive os patogênicos como *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes*, têm o seu crescimento favorecido (Tapia *et al.*, 2000; Allende *et al.*, 2004) e já foram isolados de alface minimamente processada (Szabo *et al.*, 2000).

*L. monocytogenes* são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, apresentam-se morfológicamente na forma de pequenos bastonetes, não produzem esporos nem formam cápsulas e movimentam-se por tombamento, através de flagelos peritríqueos, quando cultivadas a 25 °C. Multiplicam-se numa faixa de temperatura de 1-2 até 45 °C com o ótimo de 37 °C e entre pH 4,4 a 9,6 com pH 7,0 sendo considerado ótimo (Holt *et al.*, 1994; Rocourt, 1999). Esse microrganismo encontra-se amplamente disseminado na natureza, além de ser capaz de multiplicar-se sob temperatura de refrigeração. São capazes de sobreviver e multiplicar sob baixas concentrações de oxigênio e sob atmosfera modificada (Francis & O'Beirne, 1997).

*L. monocytogenes* já foi isolada de fezes de diversos animais, de esgoto, de solo e de diversos alimentos incluindo vegetais prontos para o consumo. No Brasil, Porto & Ubaldi-Eiroa (2001) isolaram esta bactéria em 3,2% de 250 amostras de vegetais. Dentre as amostras positivas encontravam-se alface, agrião e salsa. Também foi isolado por Martins *et al.* (2003) de espinafre minimamente processado.

Nos Estados Unidos, esta bactéria foi isolada de alface minimamente processada (Steinbruegge *et al.*, 1998), de mistura de alface, cenouras, tomates, pepinos e repolho minimamente processados (Lin *et al.*, 1996) e repolho, pepinos, batatas e rabanetes minimamente processados (Heisick *et al.* 1989).

Na Alemanha, foi isolada de amostras de saladas minimamente processadas (Teufel e Bendzulla, 1994 apud Notermans, 1998).

No Reino Unido, *L. monocytogenes* foi isolada de vegetais para salada e saladas prontas (Harvey e Gilmour 1993; Sizmur e Walker 1988).

A listeriose geralmente ocorre em um grupo de risco que inclui gestantes, recém-nascidos e adultos imunocomprometidos, podendo acometer pessoas saudáveis não gestantes. Esta doença em gestantes pode ocorrer em qualquer período da gestação sendo mais freqüente durante o terceiro trimestre quando, então, pode provocar o aborto espontâneo. As manifestações são similares à uma gripe branda, com febre, dor de cabeça ou sintomas gastrintestinais. Em recém nascidos, a listeriose é grave e freqüentemente leva a óbito, por causar septicemia, pneumonia e

meningite. Adultos não gestantes apresentam septicemia, meningoencefalite, sendo a meningite e a bacteremia os mais relatados. Sintomas ligados ao sistema nervoso central incluem a confusão mental. Outras manifestações são a endocardite e raras infecções focais (Slutsker e Schuchat, 1999).

Esta bactéria, dentre outros patógenos, merece destaque na microbiologia de alimentos porque pode sobreviver sob condições adversas se comparada a outras bactérias não formadoras de esporos de importância em alimentos. Além disso, possui a habilidade de colonizar, multiplicar-se, formar biofilmes, e de persistir nos equipamentos (Fenlon, 1999).

O uso de desinfetantes adequados não é garantia de que os microrganismos patogênicos são eliminados durante o processamento mínimo de vegetais. A eficiência do cloro na eliminação de *L. monocytogenes* da superfície de vegetais é limitada, não sendo possível garantir a sua eliminação do produto (Zhang e Farber, 1996; Szabo *et al.*, 2000). Esses dados concordam com os obtidos por Brackett (1987) que verificou que o uso de cloro (200ppm) não foi eficiente na eliminação de *L. monocytogenes* de produtos processados frescos. Beuchat e Brackett (1990) constataram que esta bactéria é capaz de multiplicar-se em alface nas mais diversas situações: sob refrigeração, na alface submetida ao tratamento com cloro e na alface embalada sob atmosfera modificada distribuída pelas indústrias de alimentos. Thayer e Rajkowski (1999) e Beuchat (2000) observaram que o processamento mínimo pode falhar devido às características da folha do vegetal, tais como rugosidades e dobras que dificultam a lavagem, quando o objetivo é manter a folha inteira. Outro fator que influencia a eficiência do processamento mínimo é a natureza hidrofóbica da cutícula cerosa presente na superfície de vegetais que protege o microrganismo da exposição ao sanitizante químico que não penetra e não dissolve esta camada. Agentes surfactantes como detergentes e álcoois podem reduzir a hidrofobicidade da cera, mas podem afetar as características sensoriais do vegetal (Beuchat, 2000).

Para aumentar a segurança microbiológica dos vegetais minimamente processados, barreiras adicionais se fazem necessárias para eliminar ou prevenir a multiplicação de patógenos, principalmente quando consideramos o seu alto teor de água, a falta de um tratamento de descontaminação mais eficiente (Szabo *et al.*, 2000) e os abusos de temperatura a que eventualmente estes produtos são submetidos (Zhang e Farber, 1996).

Os processos tradicionais de conservação de alimentos geralmente empregam altas temperaturas que, apesar de satisfazerem como tratamento de descontaminação, não satisfazem quando se trata de manter as características *in natura* e de frescor dos alimentos sólidos e ingredientes secos. Já os procedimentos de sanitização química têm problemas quanto aos



resíduos e poluição ambiental. Por isso, começaram a surgir métodos alternativos de conservação e, entre eles, um dos mais estudados, a irradiação que pode ser empregada para aumentar a vida de prateleira de hortaliças e frutas minimamente processadas (Hoover, 1997).

A irradiação é um processo não-térmico que pode ser utilizado de maneira eficaz para eliminar ou reduzir a população de microrganismos patogênicos para níveis aceitáveis em alimentos crus ou minimamente processados (Loaharanu, 1996). Também pode ser utilizada para inibir brotamento de tubérculos, raízes e bulbos; para atrasar a maturação e senescência em frutas e vegetais e para desinfestação, entre outros. Esta tecnologia utiliza a radiação ionizante como forma de energia, existindo três tipos diferentes apropriados para o tratamento de alimentos: os raios gama, o feixe de elétrons e os raios X com limites de energia estabelecidos (Diehl, 1995; Brasil, 2001b).

Os raios gama têm como fontes o  $^{60}\text{Co}$ , com energia de 1,17 e 1,33 MeV e meia vida de 5,27 anos e o  $^{137}\text{Cs}$  com energia de 0,66 MeV e meia vida de 30 anos. Estes raios de alta energia podem penetrar profundamente, tornando possível o tratamento de grandes volumes de alimentos (Diehl, 1995). O feixe de elétrons, utiliza uma corrente de elétrons de alta energia, com no máximo 10 MeV, que são emitidos por um equipamento. Seu poder de penetração depende do nível de energia (Diehl, 1995). Os raios X, com energia de no máximo 5 MeV, têm propriedades físicas semelhantes às dos raios gama, como maior poder de penetração em relação ao feixe de elétrons, porém diferem quanto à sua origem, já que os raios X são produzidos por um equipamento (Diehl, 1995).

Os raios ionizantes danificam diretamente o DNA de organismos vivos ou indiretamente, através da formação de produtos radiolíticos que reagirão com outras moléculas, interferindo no crescimento e reprodução da célula (Diehl, 1995).

Quando a radiação ionizante é absorvida pelo material biológico, há a possibilidade de ocorrer o efeito direto. As moléculas de ácidos nucléicos poderão ser ionizadas ou excitadas, iniciando uma cadeia de eventos que poderá levar à morte celular. Um outro efeito, mais evidente é o causado pela interação da radiação com outros átomos e moléculas no interior da célula, principalmente a água. Esta reação, conhecida como radiólise, produz radicais livres que difundem no meio em que se encontram e provocam danos no DNA. Este último é o efeito indireto e é considerado mais importante no dano ao DNA que o efeito direto (Diehl, 1995).

A irradiação é conhecida como "pasteurização a frio" uma vez que pode eliminar patógenos sem o aumento substancial da temperatura do produto e, dependendo da dose, sem causar alterações profundas nas características físicas ou químicas do alimento (Thayer *et al.*,

1995). A ação da radiação gama não se restringe à superfície, uma vez que penetra no produto e elimina microrganismos que estejam presentes nas dobras e vincos das folhas, sendo então muito interessante para o tratamento de vegetais (Yu *et al.*, 1996).

Assim como todos os métodos de preservação de alimentos, a irradiação também tem suas limitações. Cada microrganismo possui determinada sensibilidade à radiação bem como cada alimento pode ser exposto a uma dose de radiação limite. A legislação brasileira permite a irradiação dos alimentos, com a dose suficiente para alcançar o objetivo desejado desde que essa dose não cause alteração sensorial no alimento (Brasil, 2001b).

Dependendo da dose empregada, poderão ocorrer alterações nos componentes dos alimentos, o que pode afetar algumas de suas características sensoriais.

A sensibilidade da bactéria à radiação pode ser influenciada pelo substrato no qual ela está presente, tais como tipos diferentes de carne (Thayer *et al.*, 1995), diferentes formulações de embutidos à base de carne (Sommers & Thayer, 2000) ou diferentes tipos de brotos de vegetais (Rajkowski & Thayer, 2000) e verduras (Niemira *et al.*, 2002; Niemira *et al.*, 2003a; Goularte *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004a). A idade da cultura influencia na sensibilidade de forma que colônias mais novas de uma forma geral são mais resistentes que as mais velhas. A temperatura de processo também exerce influência (Lou e Yousef, 1999).

Sugere-se que o microrganismo *Listeria* sp seja igual ou levemente mais resistente que outros patógenos não formadores de esporos como *Staphylococcus aureus*, *Y. enterocolitica* e *Salmonella* Typhimurium (Lou e Yousef, 1999).

Além de reduzir a população de patógenos, a irradiação pode, como uma vantagem a mais, reduzir a população de microrganismos deteriorantes aumentando, em consequência, a vida de prateleira do produto.

A vida de prateleira de hortaliças minimamente processadas encontradas nos supermercados da cidade de São Paulo (Brasil) é de 6-8 dias. Esta vida de prateleira é muito influenciada pela temperatura de armazenamento (dado observado na cidade de São Paulo).

A vida de prateleira de produtos alimentícios é determinada a partir da recusa de compra do produto pelos consumidores, em função de características sensoriais, tais como sabor e aroma não característicos, perda de textura, entre outros, que no momento da compra não satisfazem as suas expectativas (Clemente, 1998). A análise sensorial é muito importante porque avalia de forma científica e objetiva as características organolépticas que têm influência na aceitação do alimento pelo consumidor. Desta forma, pode ser empregada no controle de qualidade medindo a

estabilidade durante o armazenamento ou no desenvolvimento de novos produtos (Dellamodesta, 1994). A percepção e atitude do consumidor são de grande importância na determinação da qualidade sensorial de um produto. Neste caso, o parâmetro avaliado é a queda da aceitação do produto durante o armazenamento, a qual é medida através de uma escala hedônica que avalia o quanto o consumidor “gosta” ou “desgosta” do produto nos diferentes tempos de armazenamento (Meilgaard *et al.*, 1999). Nos últimos anos, a vida de prateleira do alimento tem sido determinada através de testes sensoriais de aceitação (Clemente, 1998 e Meilgaard *et al.*, 1999).

O teste de aceitação é uma ferramenta adequada de análise, pois avalia quantitativamente o grau de apreciação de um produto (Meilgaard *et al.*, 1999). A utilização da escala hedônica permite avaliar mais de um atributo numa mesma amostra, sendo estes aparência, aroma, sabor e textura (Meilgaard *et al.*, 1999; Villanueva *et al.*, 2000).

Com a demanda atual por alimentos com características próximas do natural, a irradiação, em combinação com outras técnicas, pode aumentar a segurança dos alimentos minimamente processados e prolongar a vida de prateleira de produtos refrigerados. Diversos estudos mostram que a irradiação pode estender a vida de prateleira de vegetais minimamente processados, como endívias (Niemira *et al.*, 2003a; Niemira *et al.*, 2004), alface (Niemira *et al.*, 2002; Foley *et al.*, 2002; Niemira, 2003b) e aipo (Prakash *et al.*, 2000b).

No intuito de aumentar a segurança microbiológica dos vegetais minimamente processados e considerando que a alface é o vegetal mais consumido no nosso país e que a irradiação de alimentos é permitida (Brasil, 2001b), propusemos-nos a desenvolver a presente pesquisa.

## 2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Determinar a dose de radiação gama necessária para reduzir em 1 ciclo logarítmico a população de *Listeria monocytogenes* ( $D_{10}$ ) inoculada em salada de alface (*Lactuca sativa*, L.) composta por 4 variedades de alface minimamente processada (Lisa, Americana, Crespa e Crespa Roxa)
- b) Determinar a dose de tolerância da alface (*Lactuca sativa*, L.) minimamente processada e irradiada, através de análise sensorial (teste de aceitação), em cada variedade de alface (Lisa, Americana, Crespa e Crespa Roxa), em separado.
- c) Estudar a vida de prateleira de cada variedade de alface minimamente processada e irradiada, através da análise sensorial (teste de aceitação) e testes microbiológicos.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Materiais**

Para a determinação do valor  $D_{10}$  de *L. monocytogenes* em salada de alface composta por 4 variedades do vegetal foram utilizados:

- Mistura de folhas de alface *in natura* (*Lactuca sativa*, L.) das variedades Lisa, Crespa, Americana e Crespa roxa adquiridas em varejo e junto à indústria processadora de frutas e vegetais localizada na cidade de São Paulo (S.P).
- 2 cepas e 2 isolados de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644, ATCC 19115, um isolado de espinafre minimamente processado e outro isolado de carne moída) pertencentes ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Para o estudo da vida de prateleira da alface irradiada foram empregados:

- Folhas de alface (*Lactuca sativa*, L.) Americana, Lisa, Crespa e Crespa roxa, minimamente processadas, adquiridas em varejo e junto à indústria processadora de frutas e vegetais localizada na cidade de São Paulo (S.P). Foram estudadas em separado.

#### **3.2. Metodologia**

##### **3.2.1. Determinação do valor $D_{10}$ para *L. monocytogenes* em salada de alface composta por 4 variedades do vegetal**

Para esta determinação foi realizada as seguintes etapas:

##### **3.2.1.1. Ensaio microbiológicos**

Esses ensaios foram realizados antes e após o processamento mínimo dos vegetais.

### **3.2.1.1.1. Preparo da amostra**

Porções de 25 g de alface foram dispostas em sacos de polietileno (PE – USA, 1985). Cada amostra de 25 g foi homogeneizada em 225 mL de solução salina 0,85 % de NaCl (LabSynth, Diadema, Brasil) com o auxílio de um homogeneizador de pistão (Seward, Londres, GB). A partir desta diluição ( $10^{-1}$ ), foram realizadas diluições decimais até  $10^{-5}$  em solução salina.

#### **3.2.1.1.1.1. Enumeração da população de aeróbios psicrófilos (Cousin et al., 2001)**

Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi semeada em superfície, com auxílio de alça de Drigalski, em Ágar Padrão para Contagem (PCA – Oxoid, Basingstoke, GB). As placas foram incubadas por 10 dias a 7 °C. As colônias foram contadas e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama do alimento (UFC/g).

#### **3.2.1.1.1.2. Enumeração da população de *Pseudomonas* sp. (Mead e Adams, 1977)**

Em placas contendo Ágar Base *Pseudomonas* e seu suplemento (Oxoid), foram semeados 0,1 mL de cada diluição na superfície, com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 48 horas a 25 °C. As colônias características foram examinadas sob luz branca ou ultravioleta, contadas, e os resultados expressos em UFC/g.

#### **3.2.1.1.1.3. Enumeração da população de *Enterobacteriaceae* (Kornacki e Johnson, 2001)**

Uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição foi semeada em profundidade, em 15-20 mL de ágar vermelho violeta bile glicose (Oxoid). Após homogeneização e solidificação do meio, foi adicionada uma sobrecamada de 10 mL de meio. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas a 35 °C quando, então, as colônias foram contadas e os resultados expressos UFC/g.

#### **3.2.1.1.1.4. Enumeração da população de bactérias lácticas (Hall et al., 2001)**

Uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição foi semeada, em profundidade, em ágar de Man, Rogosa e Sharp (MRS) (Oxoid). Após homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas por 72 horas a 30 °C em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid). As colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/g.

#### **3.2.1.1.1.5. Determinação do Número Mais Provável (NMP) coliformes a 45°C (Kornacki e Johnson, 2001)**

Três alíquotas de 1 mL de cada diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram inoculadas em uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST, Oxoid) que foram incubados a 35 °C por 48 horas. Após este período, os tubos que apresentaram crescimento com produção de gás foram semeados em tubos de caldo EC. Estes tubos foram incubados em banho-maria a 45 °C por 24 horas. Os tubos com crescimento e produção de gás foram considerados positivos. Paralelamente, foram incubados um tubo de caldo EC (Oxoid) com *E.coli* (controle positivo) e um segundo tubo inoculado com *Enterobacter aerogenes* (controle negativo). Os resultados foram expressos em NMP/g através da tabela de número mais provável (Blodgett, 2001).

#### **3.2.1.1.1.2. Pesquisa de *Salmonella* sp. (Flowers *et al.*, 2001)**

Uma porção de 25 g da amostra foi homogeneizada em 225 ml de caldo lactosado (Oxoid) e incubado a 35 °C por 24 horas. Decorrido esse período, 0,1 mL do caldo lactosado foi transferido para 10 mL do caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) e incubado a 42 °C por 24 horas. Simultaneamente, foi adicionado 1 mL do caldo lactosado a 10 mL do caldo tetrationato de Kauffman (Oxoid) e incubado a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, foram semeados em placas contendo ágar Hektoen Enteric (HE, Oxoid) e ágar bismuto sulfito (BS, Oxoid). Após incubação a 35 °C por 24 horas, as 3 colônias suspeitas foram inoculadas em ágar ferro lisina (LIA, Oxoid) e ágar triplice açúcar ferro (TSI, Oxoid), que foram incubados a 35 °C por 24 horas. As colônias características foram submetida às provas bioquímicas em meio EPM (Toledo *et al.*, 1982a), MILi (Toledo *et al.*, 1982b) e Citrato de Simmons (Oxoid), incubados a 37 °C por 24 horas. Após a identificação bioquímica, foi realizada a confirmação através de teste sorológico de aglutinação em lâmina com soro polivalente para *Salmonella* (PROBAC do Brasil, São Paulo, Brasil).

### 3.2.1.1.3. Pesquisa de *Listeria* sp. (Hitchins, 2003)

Uma porção de 25 g da amostra de mistura de 4 variedades de alface foi homogeneizada em 225 mL de caldo BLEB (Buffered Listeria Enrichment Broth - Oxoid) e incubada a 30 °C por 4 horas, após as quais adicionou-se o suplemento “Listeria selective enrichment supplement” (Oxoid) no caldo BLEB foi adicionado e a amostra incubada por mais 20 horas a 30 °C. Em seguida, semeou-se, de maneira a se obter colônias isoladas, em placas de ágar Palcam (Oxoid) e de ágar Oxford (Oxoid) que foram incubadas por 48 horas a 37 °C. De 3 a 5 colônias características, em cada meio, foram repicadas em placas de ágar soja tripticaseína (TSA, Oxoid) adicionado de 0,6 % de extrato de levedura (YE, Oxoid) para verificação de sua pureza. Posteriormente, as colônias suspeitas de serem *L. monocytogenes* foram submetidas à identificação bioquímica através dos testes de produção de catalase e β-hemólise; fermentação de carboidratos (xilose, manitol, ramnose e dextrose) e motilidade.

### 3.2.1.2. Processamento mínimo

Na etapa de seleção foram retiradas as folhas danificadas e as demais lavadas em água corrente. Para a remoção do excesso de água utilizou-se centrífuga doméstica (Supreme Plastic Manufacturing Co., China). Em seguida, as amostras foram submersas em solução de cloro 200 ppm por 15 minutos. Uma última lavagem foi realizada para remover resíduos do sanitizante utilizado e as folhas foram novamente centrifugadas para a retirada do excesso de água. As amostras foram guardadas sob refrigeração (10 °C) para melhor conservação das folhas do vegetal.

### 3.2.1.3. Preparo do inóculo

A partir das culturas estoque de cada cepa e de cada isolado de *L. monocytogenes* (item 4.1.) mantidas a -70 °C em 0,8 mL de caldo soja tripticaseína acrescido de 0,6 % de extrato de levedura (TSB-YE) e 0,2 mL de glicerol, transferiu-se um inóculo para caldo TSB-YE que foi incubado por 24 horas a 37 °C.

Cada caldo foi semeado separadamente em placas de Petri contendo ágar soja tripticaseína acrescido de 0,6 % de extrato de levedura (TSA-YE) que foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após o período de incubação, foi transferida uma colônia de cada cepa, separadamente, para cada erlenmeyer contendo 100 mL de caldo TSB-YE, que foi incubado por 24 horas a 37 °C. Em seguida, 10 mL de cada erlenmeyer foram transferidos para um tubo



Falcon, completando 40 mL em cada um, obtendo-se então o *pool* das 4 cepas. Foram preparados no total 4 tubos falcon. Estes foram centrifugados a 712 g por 30 minutos a 10 °C (MIKRO 22, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha) e o sedimento de cada tubo falcon foi resuspenso em 100 mL de solução de NaCl 0,85 %. A determinação dos inóculos foi realizada através de semeadura em profundidade, em ágar TSA-YE com uma sobrecamada de Oxford, com incubação por 24 horas a 37 °C. Após a incubação, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL.

#### **3.2.1.4. Contaminação da mistura de folhas de alface**

As amostras de alface foram contaminadas de acordo com o proposto por Niemira *et al.* (2002). Em um recipiente fundo, foram colocados 6,0 L de água destilada estéril gelada (2-5 °C) e adicionado o *pool* das cepas de *L. monocytogenes*, previamente lavadas com solução salina. Esta solução foi homogeneizada e em seguida houve a imersão das folhas de 4 variedades de alface (aproximadamente 600 g) que permaneceram nesta solução por 5 minutos durante os quais foram realizados movimentos para que a contaminação fosse a mais homogênea possível. Após a contaminação, essa amostra foi centrifugada (Supreme Plastic Manufacturing Co., China) para retirada do excesso do inóculo. As amostras foram divididas em porções de 25 g de alface e dispostas assepticamente em bolsas de polietileno. A seguir foram irradiadas.

#### **3.2.1.5. Irradiação**

As amostras de alface embaladas foram transportadas para Embrarad S.A. (Cotia, SP) em caixa de material térmico isolante, contendo gelo seco e foram irradiadas em irradiador JS 7500 (Nordion, Kanata, Canadá), cuja fonte é o <sup>60</sup>Co. As doses a que foram expostas foram de 0,3; 0,6; 0,9; e 1,2 kGy. Estas amostras foram acompanhadas por uma testemunha, ou seja, que não foi irradiada. A taxa de dose dos experimentos para determinação do valor D<sub>10</sub> variou de 1 kGy/h a 1,33 kGy/h. Foram utilizados dosímetros Hardwell red perspex (UK), com ± 5% de exatidão e ± 2% de precisão.

Foram realizados três experimentos, cada um deles com amostra em triplicata para cada dose de radiação e duplicata para cada contagem da população do microrganismo inoculado.

### **3.2.1.6. Determinação da população de *L. monocytogenes* sobrevivente à irradiação (Kang e Fung, 1999 modificada)**

Porções de 25 g da amostra testemunha e da irradiada foram diluídas em solução salina 0,85 % de NaCl. Duas alíquotas de 1,0 mL de cada diluição foram semeadas, separadamente, em TSA-YE em profundidade. Após a solidificação do meio, uma sobrecamada de 10 mL de meio Oxford foi acrescentada. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e as colônias suspeitas foram submetidas a análises bioquímicas descritas no item 3.2.1.1.3.

### **3.2.1.7. Cálculo do valor $D_{10}$**

O valor  $D_{10}$  foi calculado, graficamente, através da análise de regressão linear realizada através do software Excel (Microsoft® Excel 97 SR-2, Redmond, WA, Estados Unidos).

## **3.2.2. Vida de Prateleira**

### **3.2.2.1. Análise sensorial**

O intervalo de avaliação para o estudo de vida de prateleira deve ser de 20% da vida de prateleira esperada, totalizando 6 pontos diferentes (Ellis, 1994). Considerando-se a vida de prateleira para um produto similar (saladas minimamente processadas embaladas em atmosfera modificada, com vida de prateleira de 6 a 8 dias), já que se trata de um produto cuja vida de prateleira não está estabelecida, as sessões de análise sensorial foram realizadas nos dias 0, 2, 5, 7, 9 e 12.

Foi realizado o método sensorial afetivo de aceitação, segundo norma da ABNT – NBR 12806 (1993) – de análise sensorial de alimentos e bebidas, para avaliar o efeito da irradiação nas características sensoriais da alface em função do tempo. Foram selecionados de 30 a 50 voluntários, através de uma ficha de cadastro (ANEXO I) para cada análise sensorial, conforme interesse em participar, estarem saudáveis, não serem fumantes, não serem gestantes e serem consumidores de alface regularmente. Este número de provadores garante uma distribuição normal da população, ou seja, uma amostragem adequada da população.

O teste de aceitação das 4 variedades de alface irradiada e não irradiada foram realizados em cabines individuais, sob luz branca, em pratos plásticos brancos codificados com números aleatórios de 3 dígitos. As amostras (uma irradiada e outra testemunha), de aproximadamente 12

g cada, foram oferecidas aos provadores com apresentação monádica e distribuídas de forma casualizada. Junto a ela foram oferecidos um copo de água mineral, dois biscoitos água e sal, um guardanapo, um garfo plástico para auxiliar a degustação e sal para temperar, caso preferissem. Os provadores foram convidados a expressar, através da ficha de avaliação (Figura 1), o grau de aceitação de uma forma geral, analisando aparência, textura (sensação ao mastigar), sabor e odor da amostra atribuindo uma nota de zero a dez, através de uma escala hedônica não estruturada de dez pontos que variou entre o “desgostei muitíssimo” e “gostei muitíssimo”. Em cada dia de análise, foram oferecidas aos provadores uma amostra testemunha (não irradiada) e uma amostra exposta a 1,5 kGy. Cada variedade de alface foi analisada separadamente em ocasiões diferentes, totalizando 4 análises de vida de prateleira. A nota de corte adotada como parâmetro de aceitação foi de 5 na escala hedônica não estruturada de 10 pontos.

**AVALIAÇÃO SENSORIAL DE ALFACE IRRADIADO**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /2004

Você está recebendo uma amostra codificada de alface irradiada. Prove-a avaliando sua aparência, aroma, sabor e textura (sensação ao mastigar o alimento) e marque com um “X” na escala abaixo o lugar (inclusive entre os pontos) que melhor represente o quanto você gostou ou desgostou da amostra, DE UMA FORMA GERAL:

Amostra no. \_\_\_\_\_

0 ————— 5 ————— 10

Desgostei                      Nem gostei,                      Gostei  
Muitissimo                      Nem desgostei                      muitissimo

Comentários:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Figura 1. Modelo de ficha de avaliação utilizada nas análises

### 3.2.2.2. Ensaio microbiológicos

Paralelamente aos testes sensoriais, as amostras foram analisadas quanto à presença ou ausência de *Salmonella* e população de bactérias do grupo coliformes a 45 °C, conforme a

Resolução – RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001a). Estas análises estão descritas nos itens 3.2.1.1.2 e 3.2.1.1.5. Além destas, foram enumeradas as bactérias aeróbias psicrotrófilas, bactérias lácticas, família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp; foram realizadas a determinação do número mais provável de coliformes a 45 °C e a detecção de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*, conforme descritos nos itens 3.2.2.1.1 até 3.2.2.1.3.

As análises da alface irradiada e da testemunha foram realizadas nos tempos 0 (até 24 horas após a irradiação), dia 2, dia 5 e dia 7 para a alface Americana; para as variedades Lisa e Crespa roxa prosseguiu até o dia 9 e para a alface Crespa até o dia 12.

### **3.2.2.3. Análise estatística**

Os resultados obtidos na análise sensorial foram submetidos à análise estatística pelo ANOVA (Minitab Inc., MINITAB for Windows versão 13, Pensilvânia, Estados Unidos) e ao teste de comparação de médias de Tukey ao nível de significância de 5 %. Estes procedimentos estatísticos permitiram avaliar se havia diferença significativa entre as amostras com nível de significância de 95 %.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Análises microbiológicas de alface antes e após o processamento mínimo

As análises microbiológicas das amostras formadas pelo conjunto de 4 variedades de folhas de alface (Americana, Lisa, Crespa e Crespa roxa) revelaram que o processamento mínimo propiciou redução média de 2,35 log UFC/g na população de *Enterobacteriaceae*, de 2,68 log UFC/g para a população de bactérias lácticas, de 3,35 log UFC/g para a população de *Pseudomonas* sp. e de 2,93 log UFC/g para a população de aeróbios psicrótrófilos. A população de coliformes a 45 °C foi praticamente eliminada com redução média de 2,42 log NMP/g. Não foram isoladas *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. nas amostras analisadas (Tabela 1).

Estes dados concordam com os de Allende *et al.* (2004) que, aplicando o processamento mínimo em *radicchio*, obtiveram uma redução de 3 log UFC/g para a população de psicrótrófilos e de bactérias lácticas. No entanto, Martins *et al.* (2004a) verificaram redução de apenas 1 log nas populações de psicrótrófilos e de *Pseudomonas* sp. e de menos de 1 log na de *Enterobacteriaceae*, após aquele processamento.

Soriano *et al.* (2001) e Nascimento *et al.* (2003) também não detectaram *Salmonella* sp. em alface minimamente processada. Porém, Martins *et al.* (2003) encontraram *L. monocytogenes* em uma amostra (espinafre) e *Salmonella* sp. em 4 amostras de vegetais folhosos minimamente processados (agrião, alface mimosa, escarola e salada de alface, cenoura e *radicchio*) de um total de 133 analisados. *L. monocytogenes* foi ainda isolada em 3 amostras de alface minimamente processada de um total de 120 analisadas por Szabo *et al.* (2000).

As populações de coliformes a 45°C em alface *in natura* nos experimentos 1 e 2 foram semelhantes (3,92 log NMP/g) porém diferiram da encontrada no experimento 3 (1,63 log NMP/g). Segundo Allende *et al.* (2004), essas diferenças podem estar relacionadas às diferentes práticas de cultivo.

As maiores reduções das populações com o processamento mínimo foram obtidas para os microrganismos aeróbios psicrótrófilos e para *Pseudomonas* sp.: 2,92 log UFC/g e 3,35 log UFC/g, respectivamente. A menor redução foi para a população de *Enterobacteriaceae* com 2,35 log UFC/g.

Nossos resultados concordam com os obtidos por Goularte *et al.* (2004) que conseguiram maiores reduções pós processamento mínimo em alface Americana picada para as populações de aeróbios psicrótrófilos (de 1,35 a 1,68 ciclos logarítmicos) e de *Pseudomonas* sp. (1,22 a 2,41

ciclos), e menor redução para a população de *Enterobacteriaceae* (de 1,00 a 1,41 ciclos) enquanto a população pós processamento mínimo de coliformes a 45 °C foi <3 NMP/g.

Tabela 1 Avaliação microbiológica das amostras de alface pré e pós processamento mínimo realizado em laboratório (média de 3 experimentos)

Microrganismos	Pré <sup>a</sup>	MP <sup>b</sup>	Redução
<i>Enterobacteriaceae</i> (log UFC/g)	4,81	2,57	2,35
Bactérias lácticas (log UFC/g)	4,41	1,73	2,68
<i>Pseudomonas</i> sp (log UFC/g)	5,95	2,59	3,35
Aeróbios psicrotrófilos (log UFC/g)	6,17	3,24	2,93
Coliformes a 45°C (log NMP/g)	3,16	0,89	2,42
<i>Listeria</i> sp (em 25 g)	Ausente	Ausente	-
<i>Salmonella</i> sp (em 25 g)	Ausente	Ausente	-

a: Alface *in natura* antes do processamento mínimo (Pré)

b: Minimamente processado (MP)

Entre os membros da família *Enterobacteriaceae* encontra-se o gênero *Salmonella* sp. que não foi isolado na presente pesquisa. Fazem parte desta família outros microrganismos considerados patogênicos como *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* e linhagens patogênicas de *E. coli*. Os dois primeiros gêneros não fermentam a lactose e, portanto, podem estar presentes quando se enumera a família *Enterobacteriaceae*. Tal fato é preocupante uma vez que esses vegetais são ingeridos sem nenhum tratamento pelo consumidor.

A eliminação de microrganismos da superfície da folha de vegetais é prejudicada pela sua estrutura fechada que também dificulta a remoção das sujidades. No caso das folhas de alface, sua superfície varia conforme a variedade. A alface Americana possui estrutura fechada, o que dificulta a limpeza enquanto a Lisa possui estrutura aberta e não possui nervuras, o que facilita o emprego do processamento mínimo. Já as alfaces Crespa e Crespa roxa, apesar de possuírem estrutura aberta, suas folhas apresentam ondulações que podem proteger o microrganismo da ação do sanitizante. Apesar de algumas variedades de alface, devido às suas estruturas, permitirem a aplicação do processamento mínimo com mais facilidade, se a população microbiana presente no vegetal *in natura* estiver alta, o vegetal minimamente processado poderá apresentar ainda, uma população microbiana alta, já que este processamento reduz, em média, de 1 a 2 ciclos logarítmicos na população microbiana presente nos vegetais (Goularte, 2003; Martins *et al.*, 2004a). Por possuírem estrutura fechada, a integridade das folhas inteiras pode ser

comprometidas durante o processamento mínimo como constatado na presente pesquisa, em que foi verificado que algumas folhas de alface Americana encontravam-se parcialmente partidas ao fim do processamento. Outro fator que contribui para a baixa eficiência do processamento mínimo é a presença de uma camada cerosa na superfície do vegetal, de natureza hidrofóbica, que protege o microrganismo da ação do sanitizante (Beuchat, 2000). A formação de biofilmes pelos microrganismos também pode ocorrer na folha do vegetal, de maneira análoga ao que acontece na superfície de equipamentos nas indústrias de alimentos, o que dificultaria o processo de higienização.

#### 4.2. Determinação do valor $D_{10}$ para *L. monocytogenes*

A população inicial de *L. monocytogenes* nas amostras contendo 4 variedades de alface variou de 6,5 a 7 log UFC/g.

O valor  $D_{10}$ , a dose necessária para causar a redução de um ciclo logarítmico na população microbiana, para *L. monocytogenes* foi determinado para o conjunto formado por folhas de alface das variedades Americana, Lisa, Crespa e Crespa roxa e variou entre 0,18 e 0,21 kGy (Figura 2).

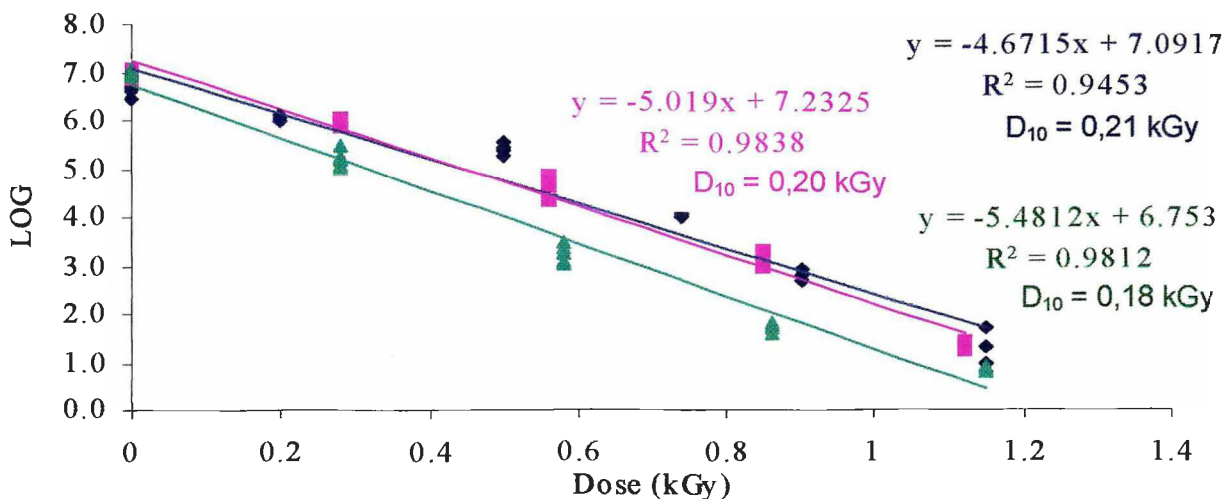


Figura 2 Comportamento da população de *Listeria monocytogenes* inoculada em mistura de folhas de alface (*Lactuca sativa*, L.) de quatro variedades diferentes (Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa) expostas à radiação ionizante.

Os valores de  $D_{10}$  obtidos nesta pesquisa são semelhantes aos encontrados por Niemira (2003b) para *L. monocytogenes* (0,19 – 0,20 kGy) em salada de alface minimamente processada

e por Niemira *et al.* (2004) quando inocularam *L. monocytogenes* em endívias (0,20 kGy). Prakash *et al.* (2000b) também observaram valores no mesmo intervalo – 0,20 kGy – para *L. monocytogenes* em aipo cortado. É interessante notar que, aparentemente, esses dados não foram influenciados pelo tipo de vegetal estudado. No entanto, eles são maiores do que os citados na literatura para *E. coli* O157:H7 inoculada em diversas variedades de folhas de alface, em separado, (0,12 – 0,14 kGy) (Niemira *et al.* 2002) e em alface Americana picada – 0,11- 0,12 kGy (Goularte *et al.* 2004).

Quando comparados aos valores  $D_{10}$  para *Salmonella* sp. em vegetais, constata-se que os resultados obtidos nesta pesquisa para *L. monocytogenes* estão dentro da faixa daqueles relatados por Goularte *et al.* (2004) para aquela bactéria (0,16 a 0,23 kGy). *Salmonella* sp., entre os patógenos Gram-negativos, e *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* entre os Gram-positivos, não formadores de esporos, são considerados os microrganismos com maior resistência à radiação (Landgraf, 2002). Portanto, ao se empregar a irradiação para reduzir para níveis não detectáveis a população de *L. monocytogenes*, obter-se-á, provavelmente, a mínima redução para os demais patógenos.

É muito importante ressaltar que os resultados encontrados são válidos para a situação proposta neste estudo. O valor  $D_{10}$  pode sofrer variações quando o microrganismo é inoculado em outros alimentos ou até para um mesmo alimento mas sob outras condições como por exemplo, embalado em atmosfera modificada ou congelado (Thayer *et al.* 1995; Thayer *et al.* 1998; Niemira *et al.* 2001; Foley *et al.*, 2001; Foong *et al.*, 2004). Outra consideração a ser feita é que cepas diferentes de um mesmo microrganismo também podem apresentar valor  $D_{10}$  diferente.

#### **4.3 Avaliação da vida de prateleira da alface minimamente processada irradiada**

Na avaliação da vida de prateleira foram realizadas análise sensorial e análise microbiológica nas duas amostras – irradiada e testemunha - para as 4 variedades de alface.

Cada variedade de alface foi analisada separadamente, o que permitiu determinar o fim da vida de prateleira de cada variedade em separado, bem como especificar as causas de rejeição de cada uma delas e minimizar o provável desvio provocado pelo impacto da aceitação de uma variedade em relação à outra. Em cada dia de análise, foram oferecidas aos membros do painel sensorial uma amostra irradiada com a dose de 1,5 kGy (taxa de dose variando de 1,0 a 1,4 kGy/h) e uma amostra testemunha (sem ter sido submetida à irradiação).



O National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMSF, 1999), dos Estados Unidos, recomenda a redução de 5 ciclos logarítmicos na população microbiana baseando-se em estudo com sementes de alfafa. Adotando o mesmo critério para a alface minimamente processada e irradiada, a dose necessária a ser aplicada é de 1,05 kGy (considerando o maior  $D_{10}$  encontrado de 0,21 kGy). Nesta fase da pesquisa, foi utilizada a dose de 1,5 kGy, por corresponder a uma redução de 5 vezes o maior valor  $D_{10}$ , extrapolado de 40%.

As amostras utilizadas no estudo da vida de prateleira foram cedidas por uma empresa processadora localizada na cidade de São Paulo, sanitizadas com cloro (Quallix Saniverd, ECON) 200ppm por 15 minutos, embaladas em filme de polietileno sob aerobiose e mantidas a 7°C.

#### **4.3.1. Avaliação da aceitação das amostras de alface irradiadas**

O teste sensorial de aceitação foi aplicado utilizando-se uma escala hedônica não estruturada de dez pontos, que varia entre o desgostei muitíssimo (nota 0) e gostei muitíssimo (10). A nota 5 dessa escala corresponde ao parâmetro “não gostei, nem desgostei” sendo considerada nota de corte. Abaixo deste parâmetro, as amostras encontram-se no campo da rejeição e neste ponto ou acima dele, a amostra é classificada no campo da aceitação.

Pela tabela 2, observa-se que os membros do painel aceitaram, no tempo zero, as amostras de alface irradiada. Vale ressaltar que a variedade Americana apresentou diferença significativa, estatisticamente, entre a amostra irradiada e a testemunha nesse dia. Os provadores relataram presença de injúrias e manchas escuras que e crocância inferior na amostra irradiada prejudicando a sua avaliação. No entanto, a média obtida por essa amostra ( $7,48 \pm 2,03$ ) encontra-se bem acima daquela considerada como nota de corte (5).

Em relação ao período do experimento, verifica-se que a variedade Americana apresentou comportamento diferente em relação às outras. Em todos os dias analisados houve diferença significativa entre a amostra irradiada e a testemunha embora a irradiada só possa ser considerada inaceitável a partir do dia 5 ( $4,96 \pm 2,35$ ), enquanto a testemunha só o foi no dia 7 ( $4,77 \pm 2,92$ ).

A alface Crespa não apresentou diferença significativa entre as duas amostras ao longo do período do experimento enquanto as amostras testemunhas das variedades Lisa e Crespa roxa foram consideradas inaceitáveis no mesmo dia, isto é, dia 5. Quanto às amostras irradiadas destas duas variedades, constata-se, pelas médias obtidas, que a Lisa foi aceita, até o dia 9 e a Crespa

Tabela 2. Comparação entre as médias obtidas no teste de aceitação para as amostras de alface Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa expostas a 1,5 kGy e as amostras testemunhas, mantidas a 10 °C, durante armazenamento, segundo teste de comparação de médias de Tukey

Variedade	Dose (kGy)	Tempo (dias)									
		0	2	5	7	9	12				
Americana	0	8,33 ± 1,45 <sup>a*</sup>	7,73 ± 1,93 <sup>xy</sup>	6,78 ± 2,14 <sup>y</sup>	4,77 ± 2,92 <sup>z</sup>	-	-	-	-	-	-
	1,5	7,48 ± 2,03 <sup>b</sup>	6,57 ± 1,99 <sup>x</sup>	4,96 ± 2,35 <sup>y</sup>	3,95 ± 2,71 <sup>y</sup>	-	-	-	-	-	-
Crespa	0	7,28 ± 2,06 <sup>a*</sup>	7,34 ± 2,36 <sup>x</sup>	7,49 ± 1,68 <sup>x</sup>	6,44 ± 2,34 <sup>x</sup>	6,30 ± 1,88 <sup>x</sup>	2,24 ± 2,54 <sup>y</sup>	-	-	-	-
	1,5	7,09 ± 2,23 <sup>a*</sup>	6,87 ± 1,94 <sup>x</sup>	6,77 ± 2,25 <sup>x</sup>	5,50 ± 1,84 <sup>y</sup>	6,63 ± 2,10 <sup>xy</sup>	3,20 ± 2,15 <sup>z</sup>	-	-	-	-
Lisa	0	7,25 ± 1,66 <sup>a*</sup>	6,68 ± 2,19 <sup>x</sup>	2,66 ± 2,27 <sup>y</sup>	2,99 ± 2,43 <sup>y</sup>	2,48 ± 2,73 <sup>y</sup>	-	-	-	-	-
	1,5	7,08 ± 1,98 <sup>a*</sup>	6,59 ± 2,91 <sup>xy</sup>	5,64 ± 2,89 <sup>y</sup>	6,07 ± 2,20 <sup>xy</sup>	5,75 ± 2,39 <sup>y</sup>	-	-	-	-	-
Crespa roxa	0	8,11 ± 1,92 <sup>a*</sup>	7,55 ± 1,82 <sup>x</sup>	4,32 ± 2,62 <sup>y</sup>	3,33 ± 3,01 <sup>y</sup>	0,67 ± 1,36 <sup>z</sup>	-	-	-	-	-
	1,5	6,87 ± 2,48 <sup>a</sup>	6,17 ± 2,28 <sup>xy</sup>	4,95 ± 2,88 <sup>a</sup>	4,31 ± 2,48 <sup>a</sup>	1,51 ± 2,11 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-

\* : Letras iguais, na mesma coluna, para uma mesma variedade de alface significam diferenças não significativas (P ≥ 0,05)

\*\* : Letras iguais, na mesma linha, para uma mesma variedade, indicam diferença não significativa (P ≥ 0,05)

roxa até o dia 5. No entanto, a média das notas dos provadores para esta última amostra encontra-se próxima à nota de corte (tabela 2).

No geral, foram motivos para rejeição: a aparência das folhas que se apresentava alterada com aspecto úmido e amolecimento das pontas, alteração no odor do vegetal sem, contudo, descreverem essa alteração; perda de crocância, escurecimento localizado nas folhas e a perda global da qualidade de frescor.

#### 4.3. 2. Análise Microbiológica

As amostras das 4 variedades de alface expostas a 1,5 kGy não apresentaram os microrganismos pesquisados ao longo do período estudado. Isto demonstra que as 4 variedades de alface minimamente processadas ao serem irradiadas com 1,5 kGy tornaram-se estáveis do ponto de vista microbiológico. Rajkowski e Thayer (2000), Prakash *et al.* (2000b), Foley *et al.* (2002), Niemira *et al.* (2002), Martins *et al.* (2004a) e Goularte *et al.* (2004) também consideram a irradiação um processo adequado para aumentar a segurança microbiológica de vegetais.

As populações da família *Enterobacteriaceae* e a de aeróbios psicrófilos, na alface Americana testemunha, apesar de variarem ao longo do período, apresentaram, no último dia, populações praticamente inalteradas em relação às iniciais. Porém, a população de *Pseudomonas* sp. apresentou decréscimo de aproximadamente 1 log UFC/g, ao contrário das bactérias lácticas, que dobraram sua população (figura 3).

Na alface Crespa testemunha (figura 4), o grupo *Enterobacteriaceae* apresentou aumento gradativo até 2,3 log UFC/g. A população de *Pseudomonas* sp. também apresentou aumento, porém mais discreto, enquanto as populações de aeróbios psicrófilos e de bactérias lácticas permaneceram no mesmo nível durante o período observado.

Nas amostras testemunhas de alface Americana e de Crespa, as populações de coliformes a 45 °C foram < 3 NMP/g, ao contrário das demais variedades em que esta população apresentou-se alta (figura 3, 4, 5 e 6).

Para as amostras testemunhas da variedade Lisa (figura 5), as populações de *Pseudomonas* sp., coliformes a 45 °C e aeróbios psicrófilos sofreram aumentos maiores que a população de *Enterobacteriaceae*, porém a de bactérias lácticas decresceu mais de 1 log UFC/g.

Na alface Crespa roxa testemunha (figura 6), as populações de bactérias lácticas e de *Pseudomonas* sp. sofreram aumento semelhante, de aproximadamente 1,5 log UFC/g. A população do grupo *Enterobacteriaceae* também aumentou, porém de maneira menos expressiva

que a apresentada por bactérias lácticas e *Pseudomonas* sp. Já as populações de coliformes a 45 °C e de aeróbios psicrotrófilos mantiveram-se as mesmas ao longo do experimento.

As amostras testemunhas das 4 variedades não apresentaram *Salmonella* sp ou *Listeria* sp..

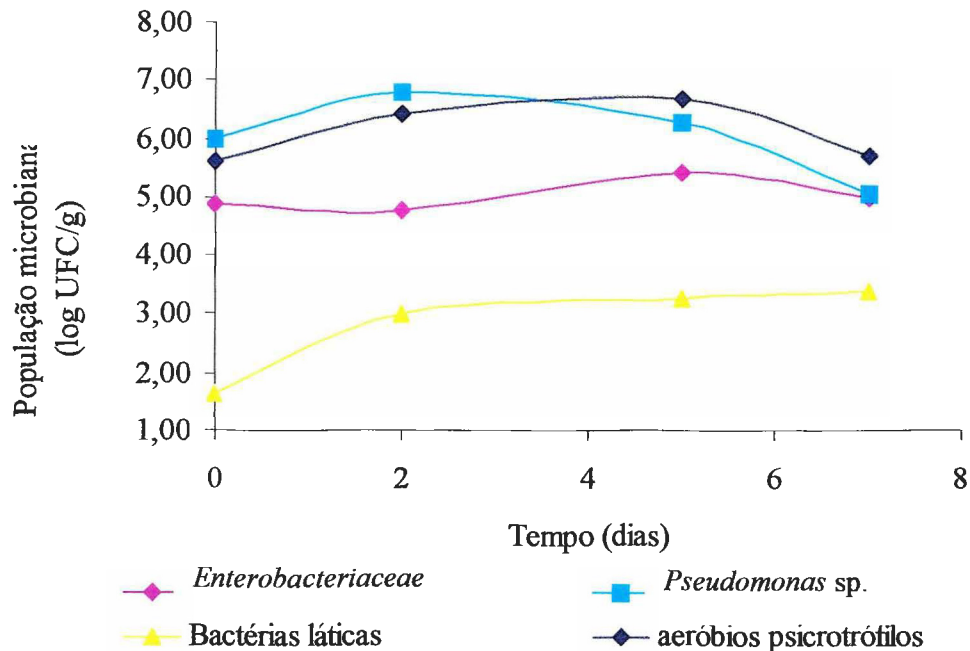


Figura 3. Comportamento das populações de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp., bactérias lácticas e microrganismos aeróbios psicrotrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Americana minimamente processada

Os resultados obtidos para o grupo dos coliformes a 45 °C nas alfaces Crespa roxa e Lisa são similares aos encontrados por Palú *et al.* (2002), em saladas de alface servidas em restaurantes universitários (2,9 a 4,4 NMP/g). Porém são inferiores aos relatados por Barbosa-Neta *et al.* (2004) em alfaces minimamente processadas, entre 2,66 a > 3,4 log NMP/g. Fröder (2005) detectou populações entre 2 e > 6 log UFC/g de coliformes a 45 °C em 96 de 133 amostras de vegetais folhosos minimamente processados. Já os resultados para as variedades Americana e Crespa concordam com Goularte *et al.* (2004) que detectaram populações inferiores a 3 NMP/g de coliformes a 45 °C em alfaces Americanas minimamente processadas adquiridas em varejo.

Observou-se que as populações de aeróbios psicrotrófilos e de bactérias lácticas apresentaram nas amostras testemunhas das 4 variedades aumentos menores que os verificados por Allende *et al.* (2004) em alface minimamente processada, após 7 dias de armazenamento sob refrigeração (3 log UFC/g).

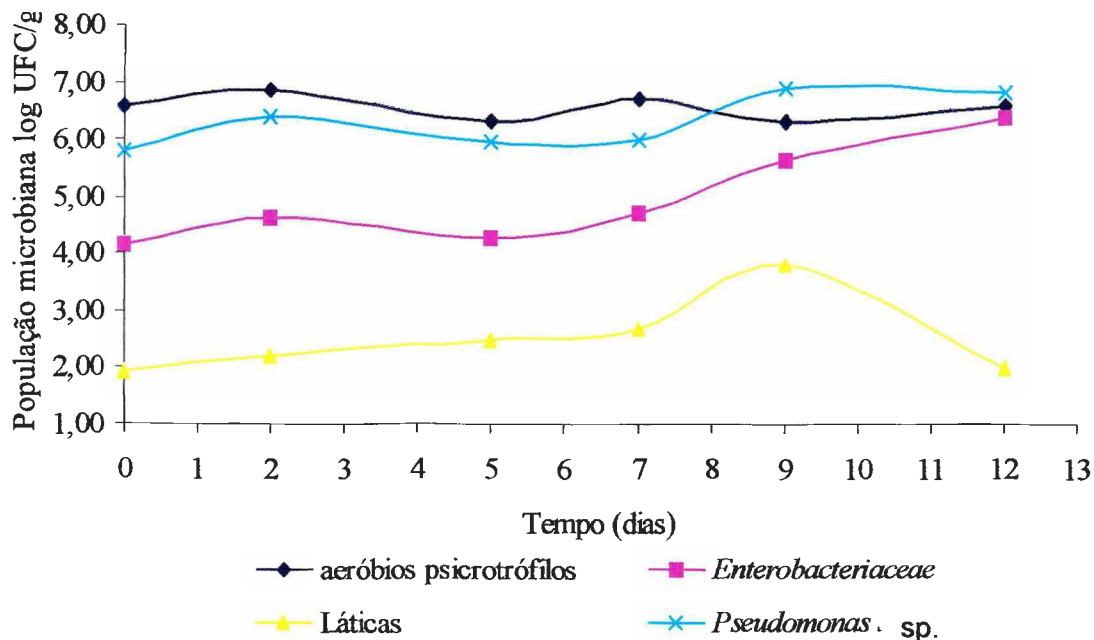


Figura 4. Comportamento das populações de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp., bactérias lácticas e microrganismos aeróbios psicrotrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Crespa minimamente processada

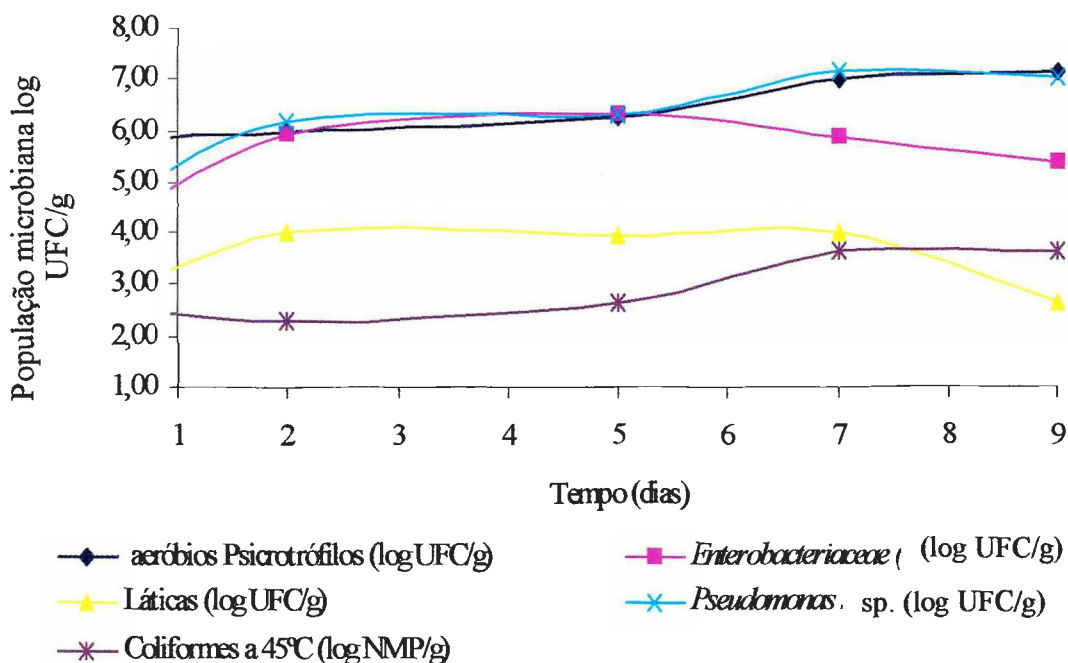


Figura 5. Comportamento das populações de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp., bactérias lácticas, coliformes a 45 °C e microrganismos aeróbios psicrotrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Lisa minimamente processada

Segundo King *et al.* (1991), a população de microrganismos deteriorantes, como *Pseudomonas* sp. e *Erwinia* sp. em vegetais minimamente processados, varia entre 4 e 7 log UFC/g o que concorda os dados obtidos nesta pesquisa. De acordo com García-Gimeno e Zuzero-Cosano (1997), populações a partir de 6 log UFC/g desses microrganismos deteriorantes indicam o início de alterações depreciativas nas características sensoriais dos vegetais. Portanto, segundo este critério, os valores observados no presente estudo para *Pseudomonas* sp. nas alfaces Americana e Crespa roxa minimamente processadas apresentam-se nesse limite após o processamento mínimo, excedendo-o ao longo da vida de prateleira. Nas variedades Crespa e Lisa, a população de *Pseudomonas* sp. excedeu o limite já no dia 2. Isto é indicativo que o processamento com cloro 200 ppm não foi suficiente para garantir a estabilidade microbiológica do vegetal e que as populações *Pseudomonas* sp. presentes nas alfaces testemunhas são a possível causa do surgimento de sinais de deterioração, como por exemplo extremidades das folhas amolecidas e úmidas e alteração no odor, sinais estes que se acentuaram com o passar do tempo.

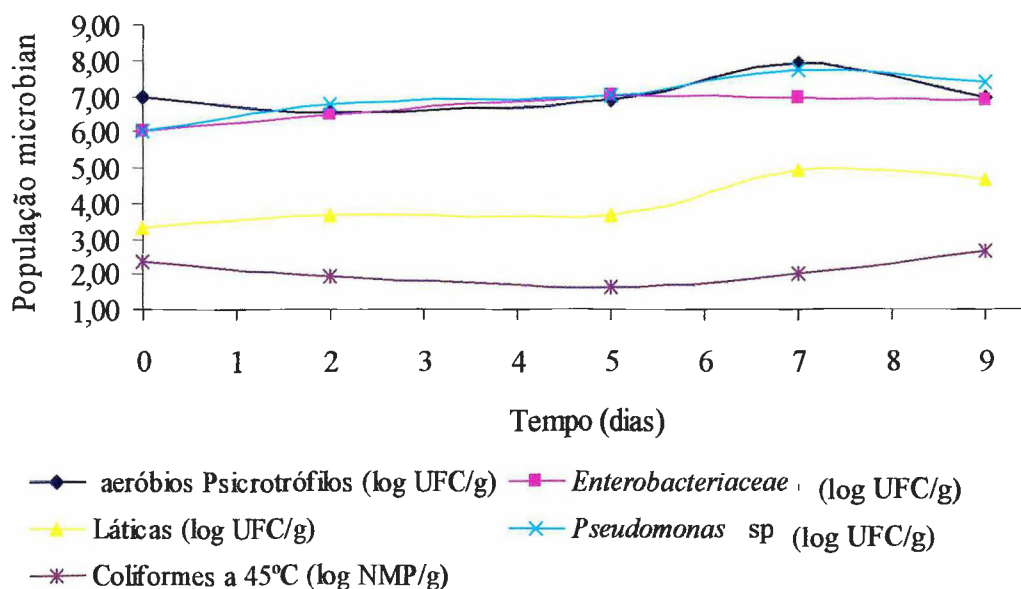


Figura 6. Comportamento das populações de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp., bactérias lácticas, coliformes a 45 °C e microrganismos aeróbios psicrotrófilos ao longo da vida de prateleira de alface Crespa roxa minimamente processada

Segundo Allende *et al.* (2004), o processamento mínimo somente é eficiente quando o vegetal apresenta população microbiana inicial baixa. Martins *et al.* (2004b) não observaram diferença significativa nas populações de *Enterobacteriaceae*, aeróbios psicrotrófilos, *Pseudomonas* sp. e coliformes a 45 °C ao longo do tempo, entre as amostras de agrião *in natura*

e o minimamente processado, concluindo que o processamento mínimo não foi eficiente na redução da população microbiana desse vegetal.

As diferenças de população observadas ao longo do período de armazenamento para os diferentes grupos de microrganismos podem ser explicadas por serem amostras diferentes e não provenientes de uma mesma cabeça de alface.

Para a determinação do fim da vida de prateleira das amostras testemunhas e irradiadas pertencentes às 4 variedades de alface, procedeu-se à escolha dos modelos matemáticos que melhor explicassem a variação da aceitação expressa pelos provadores em relação ao tempo. Essa escolha baseou-se nos seguintes critérios: significância dos parâmetros da equação ( $p < 0,05$ ), teste de significância para a regressão, significância da falta de ajuste do modelo e o coeficiente de determinação (valor  $r^2$ ). Estes modelos, bem como suas curvas, podem ser observados nas figura 7, 8, 9 e 10 e a análise de variância dos dados obtidos para as 4 variedades de alface testemunhas e irradiadas podem ser observados dos anexos de 2 a 13.

Os coeficientes dos modelos matemáticos escolhidos para as 4 variedades de alface, tanto testemunhas quanto irradiadas, são estatisticamente significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Observa-se nas figuras 7 a 10, que os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) são altos, indicando que os modelos escolhidos apresentam ótimos ajustes em relação às médias obtidas em cada dia de análise.

O valor do coeficiente de determinação  $r^2$  indica quanto modelos matemáticos conseguem explicar da variação total das notas de aceitação os. Apesar destes valores nunca serem superiores a 50 %, é possível observar que a variação na aceitação provocada pela variável tempo é muito bem explicada pelos modelos propostos (parâmetro SQ da regressão e da variável tempo nos anexos 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12 e 13). O valor  $r^2$  é baixo porque provavelmente há outros fatores determinantes na vida de prateleira das alfaces além do tempo de armazenamento, como por exemplo os diferentes graus de aceitação individual dos provadores em relação às alfaces e também à inhomogeneidade da própria amostra.

Os modelos para as variedades Americana, Crespa roxa e para a Lisa irradiada apresentaram falta de ajuste não significativa o que é considerado ideal. No entanto, o mesmo não ocorreu para os modelos da variedade Crespa e para a Lisa testemunha. Nestes casos, apesar da falta de ajuste ser estatisticamente significante, os modelos propostos foram considerados satisfatórios uma vez que os demais critérios (coeficiente de determinação, significância dos parâmetros da equação e significância da regressão) foram satisfeitos.

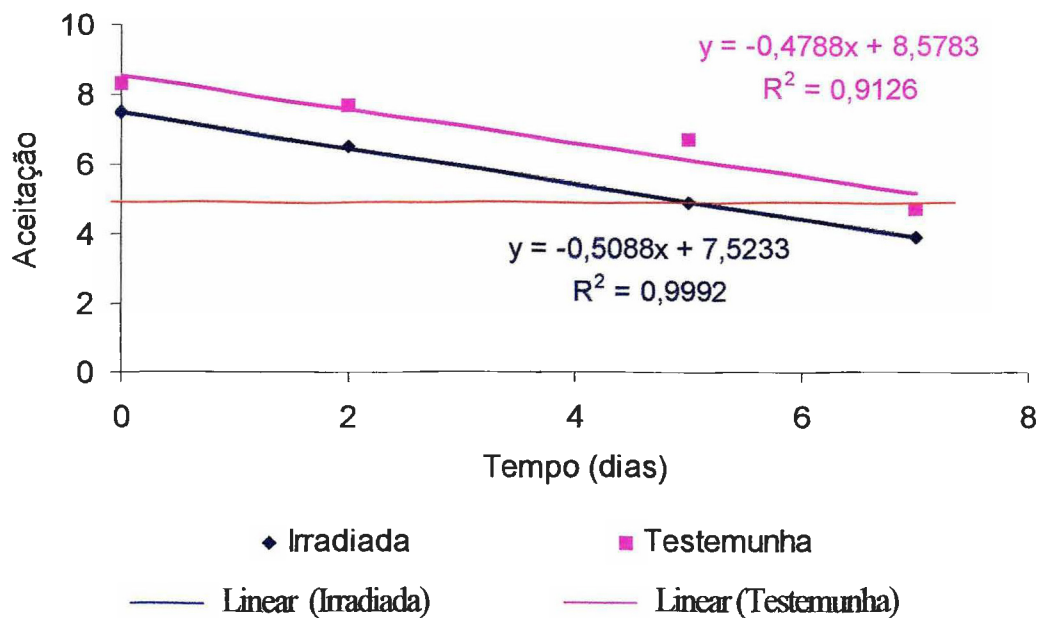


Figura 7. Aceitação da alface Americana minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 7 dias a 7°C.

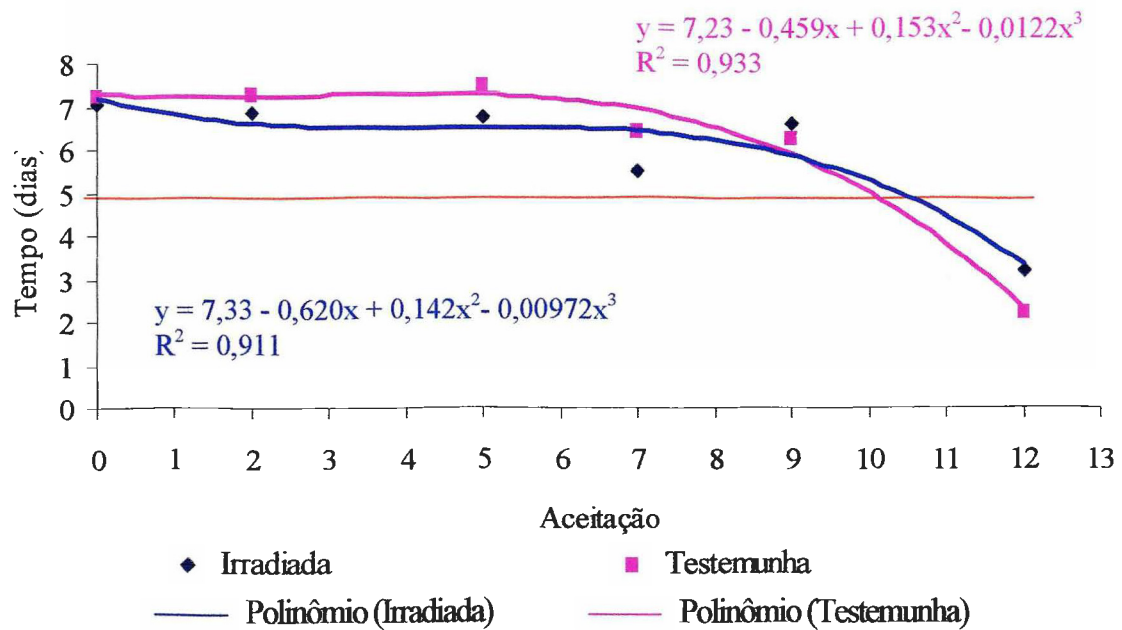


Figura 8. Aceitação da alface Crespa minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 12 dias a 7°C.



Considerando o valor 5,0 como nota de corte para a aceitação ou não do produto e os modelos matemáticos escolhidos, estimou-se a vida de prateleira da alface Americana irradiada em 5,0 dias e da amostra testemunha em 7,5 dias; para a Crespa roxa, o período foi de 5,1 dias para a irradiada e 4,4 dias para a testemunha. Já para a variedade Crespa, esse período foi praticamente o mesmo para as duas amostras: 10,8 dias para a irradiada e de 10,6 dias para a testemunha e a Lisa testemunha apresentou vida de prateleira de 3,0 dias.

Em relação à amostra irradiada da variedade Lisa, a vida de prateleira foi considerada de 7,2 dias, com média de aceitação de 5,8 que corresponde ao vértice da parábola, representação gráfica da equação do 2º grau, que foi o modelo matemático que apresentou o melhor ajuste dos critérios adotados.

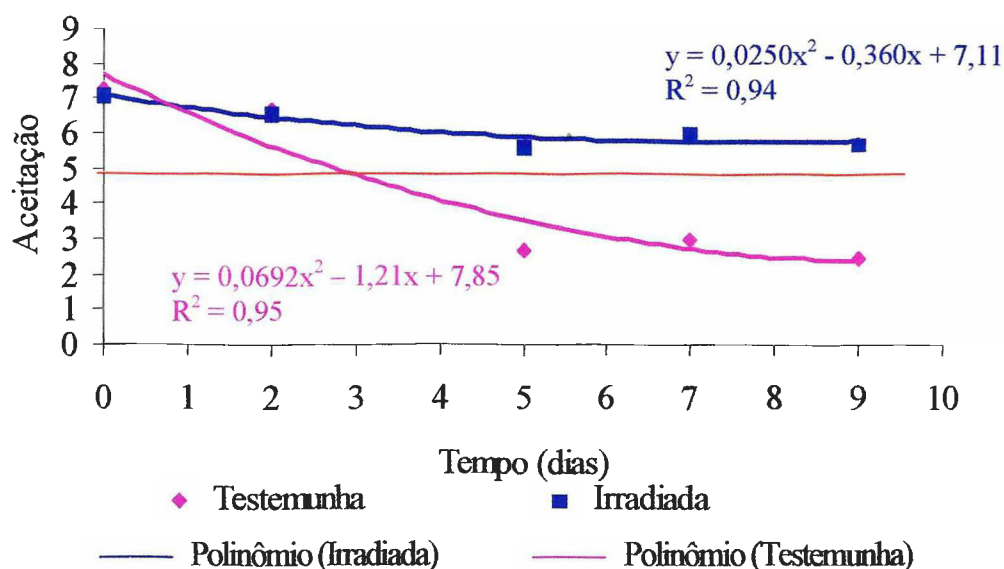


Figura 9. Aceitação da alface Lisa minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 9 dias a 7°C.

De maneira geral, o final da vida de prateleira das amostras irradiadas foi determinado por alterações químicas inerentes ao envelhecimento do vegetal enquanto para o final da vida de prateleira da testemunhas, provavelmente, também contribuiu o número elevado de microrganismos do gênero *Pseudomonas* sp.

A presença de injúrias e manchas escuras que prejudicaram a aparência da alface Americana irradiada aliada à perda de crocância, constatadas no dia 0, intensificaram-se durante o período do experimento, segundo comentários dos membros do painel de degustação. Já a amostra testemunha, foi considerada como característica pelos provadores até o dia 2, mas no dia 5 a aparência foi considerada ruim. No dia 7, a aparência foi considerada péssima, a textura

pouco crocante e comentários como “esforço para comer” ou ainda “não comeria” foram observados. Neste último dia, foram observados sinais de deterioração de possível origem microbiana.

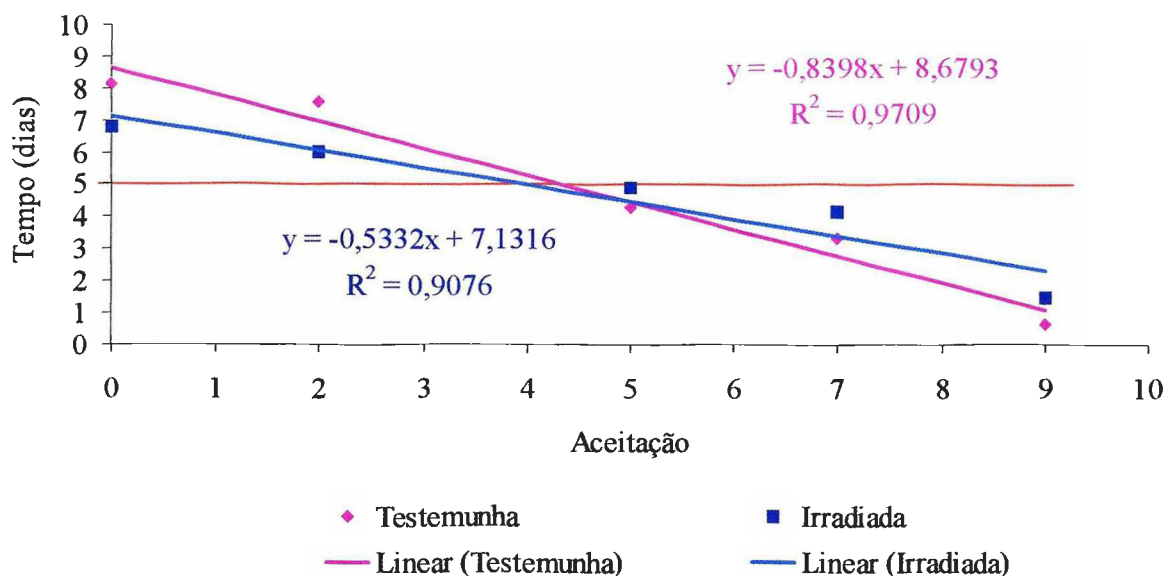


Figura 10. Aceitação da alface Crespa roxa minimamente processada irradiada com 1,5 kGy e da testemunha ao longo do armazenamento por 9 dias a 7°C.

Embora tenham sido consideradas frescas no dia 0, as amostras irradiadas das variedades Lisa, Crespa e Crespa roxa apresentaram menor crocância que as amostras testemunhas. Nos últimos dias de análise, essas amostras apresentaram além da perda de crocância, o desenvolvimento de odores ofensivos motivos pelos quais foram consideradas repugnantes. As mostras irradiadas foram perdendo, gradativamente, seu frescor e a coloração verde não era tão intensa a partir do dia 7. Estes atributos foram intensificando-se até o último dia de análise. Além disso, desde o dia 0, os provadores perceberam a coloração natural da alface Crespa roxa como desagradável o que prejudicou o julgamento das amostras tanto testemunhas quanto irradiadas.

Ao final do processamento mínimo, por possuir estrutura fechada, as folhas da alface Americana apresentavam-se parcialmente partidas e estas feridas contribuíram para seu escurecimento mais intenso que o das demais variedades, que possuem estrutura mais aberta e de cor verde mais intensa. A aceitação pelo mercado consumidor no que se refere às características sensoriais das alfaces Americana foi maior para a amostra testemunha. A perda de textura e o

escurecimento (incluindo presença de manchas) foram os principais motivos de rejeição para essa variedade quando irradiada.

Apesar das amostras testemunhas das variedades Crespa e Crespa roxa terem sido rejeitadas por motivos diferentes das irradiadas, os provadores não indicaram preferência entre elas. Para a variedade Lisa, no entanto, os provadores manifestaram preferência pela amostra irradiada por manter as características organolépticas por mais tempo que a testemunha. Esta amostra testemunha foi a que apresentou menor vida de prateleira entre as variedades estudadas (3 dias), com microbiota apresentando altas populações de *Pseudomonas* sp. (6,2 log UFC/g) e *Enterobacteriaceae* (6,0 log UFC/g).

As amostras testemunhas das variedades Crespa roxa e Americana apresentaram aproximadamente 5 dias de vida de prateleira. A Crespa roxa apresentou as maiores populações de *Pseudomonas* sp. e de *Enterobacteriaceae* (ambas 7 log UFC/g) na data de sua rejeição além de 3,5 log UFC/g de bactérias láticas e 1,5 log NMP/g de coliformes a 45 °C. Observou-se que foram primeiramente rejeitadas as variedades testemunhas que possuíam populações microbianas maiores, ou seja a Crespa roxa e a Lisa. Já a Americana apresentou na data de sua rejeição, aproximadamente 6 log UFC/g de *Pseudomonas* sp. e 5,5 log de *Enterobacteriaceae*, além de 3,0 log de bactérias láticas e coliformes a 45 °C inferior a 3 NMP/g. A alface Crespa apresentou populações microbianas semelhantes às da Americana com 10 dias de armazenamento o que pode ter contribuído para sua maior vida de prateleira.

Os atributos que contribuíram para a depreciação das 4 variedades irradiadas mais mencionados pelos provadores foram perda de crocância e escurecimento. Tanto a aparência como a crocância do vegetal são fatores muito importantes para o consumidor no momento da compra porque a aparência é o primeiro atributo do alimento a ser analisado (Allende *et al.*, 2004) enquanto a crocância está relacionada ao frescor do vegetal (Fillion e Kilcast, 2002; Allende *et al.*, 2004; Ragaert *et al.*, 2004).

A textura do vegetal está relacionada com a integridade da estrutura da pectina e da celulose. Quando essas estruturas são afetadas, a textura do vegetal fica comprometida. Howard *et al.* (1995) verificaram a alteração na solubilidade da pectina e redução no grau de esterificação da celulose em tomate, pimenta e cebola minimamente processados e irradiados com 1 kGy e armazenados durante 1 semana. Estas alterações levaram a perda de textura desses vegetais. Alterações semelhantes foram observadas por Goularte *et al.* (2004) em alface Americana picada irradiada com 1,1 kGy após 24 horas; em aipo cortado exposto a 1,0 kGy, armazenado durante 15 dias (Prakash *et al.* 2000b) e em alface exposta a 0,35 kGy (Prakash *et al.* 2000a). Porém

outros autores (Foley *et al.*, 2002; Niemira *et al.*, 2002 e Niemira *et al.*, 2003) não observaram alterações na estrutura de alface e endívia expostas a doses de até 1,0 kGy.

O escurecimento observado em hortaliças geralmente é provocado pela ação de enzimas polifenoloxidase, catalase e peroxidase sobre substratos presentes na folha do vegetal e pela ação da fenilalanina amônia liase, reguladora do metabolismo fenólico e responsável pela síntese de substratos para polifenoloxidase e peroxidase, independente da ação da radiação (Brochlehurst, 1994). Hanotel *et al.* (1995) observaram que a chicória picada irradiada com 3 kGy apresentou um escurecimento mais pronunciado que a amostra não irradiada porque a radiação provocou um aumento da permeabilidade das membranas lipídicas celulares e subcelulares o que teria facilitado o acesso das enzimas ao substrato. Apesar da radiação ter provocado redução nas atividades das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, também provocou a redução na atividade da glutathione, um antioxidante natural do vegetal, e um aumento na atividade da fenilalanina amônia liase e do peróxido, que é substrato da peroxidase. O maior escurecimento de vegetais irradiados em relação a seus controles também foram observados em alface Americana picada (Goularte *et al.* 2004), em alface Crespa Roxa (Allende *et al.* 2004) e em endívias (Niemira *et al.* 2004).

Considerando a vida de prateleira de cada variedade de alface, a do conjunto das 4 variedades irradiado é de 5 dias, enquanto a do conjunto não irradiado é de 3 dias.

## 5. Conclusões

Baseado nas condições em que esta pesquisa foi desenvolvida, podemos concluir que:

- a dose necessária para redução de 5 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* nas 4 variedades de alface - Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa - é de 1,05 kGy.

- as variedades de alface estudadas - Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa – não foram rejeitadas pelo painel de provadores quando expostos à dose de 1,5 kGy, considerada a dose de tolerância.

- a vida de prateleira do conjunto das 4 variedades de alface (Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa) irradiada foi de 5 dias enquanto a do conjunto não irradiado foi de 3 dias.

O processo de irradiação mostrou-se exequível não só para aumentar a segurança microbiológica das variedades de alface Americana, Crespa, Lisa e Crespa roxa como também estender a vida de prateleira desses vegetais em até 2 dias.

## 6. Referências Bibliográficas

- ABNT - NBR 12806 – Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas. Fevereiro, 8 páginas, 1993.
- ALLENDE, A.; AGUAYO, E.; ARTÉS, F. Microbial and Sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 91, p. 109-117, 2004.
- Anuário da Agricultura Brasileira – **Agrianual**. FNP Consultoria & Comércio Ltda. ARGOS Comunicação, 2000.
- BARBOSA-NETA, R.X.; HOLLAND, N.; DAMASCENO, K.S.F.S.C. Análise dos perigos e pontos críticos de controle da alface servida no restaurante universitário da UFRN. **Hig. Alimentar**, v.18, n.126/127, p. 36-43. 2004.
- BEUCHAT, L. R., BRACKETT, R. E. Growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging, temperature and time. **J. Food Sci.**, v. 55, p. 755 – 758, 870, 1990.
- BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **J. Food Prot.**, v.59, p.204-216, 1996b.
- BEUCHAT, L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, v. 7 n. 4/5, p. 223 – 228, 1996a.
- BEUCHAT, L.R. Use of sanitizers in raw fruit and vegetable processing. In: ALZAMORA, S.M., TAPIA, M.S., LÓPEZ-MALO, A. **Minimally processed fruits and vegetables. Fundamental aspects and applications**. Aspen Publication. Maryland, 2000.
- BLODGETT, R. Most Probable Number from Serial Dilutions. Appendix 2. **Bacteriological Analytical Manual Online**. 8<sup>th</sup> edition. Janeiro de 2001. Acessado em 22/09/2004, Available Online <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>
- BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 50, p. 999 – 1003, 1987.
- BRACKETT, R.E. Incidence, contributing factors and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 15, p. 305-311, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1<sup>a</sup> parte da resolução – RDC n° 12, de 2 de janeiro de 2001a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 21, de 26 de janeiro de 2001b.

- BROCKLEHURST, T.F. Delicatessen salads and chilled prepared fruits and vegetable products, 1994. In: MAN, C.D.M. & JONES, A.A. **Shelf life evaluation of foods**. Blackie Academic and Professional. 321p.
- CLEMENTE, E. S.; Caracterização química, nutricional, física e sensorial de dois cultivares de Brócolis (*Brassica oleracea* L. var. itália Baron e *Brassica oleracea* L. var. itálica ramoso-Piracicaba): um estudo de vida de prateleira. Campinas, 1998. **Dissertação de Mestrado da Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas**, 160p.
- COUSIN *et al.* Psychrotrophic microorganisms. DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, D.C: American Public Health Association (APHA), p.159-166, 2001.
- DELLAMODESTA, R.C. Manual de análise sensorial de alimentos e bebidas: geral – R.J.: EMBRAPA – CTAA, 1994.
- DIEHL, J.F. **Safety of Irradiated Foods**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: MARCEL DEKKER, 1995, 454p.
- ELLIS, M.J. The methodology of shelf life determination, 1994. In: MAN, C.D.M. & JONES, A.A. **Shelf life evaluation of foods**. Blackie Academic and Professional. 321p.
- FENLON, D.R. In: MARTH, E. H., RYSER, E.T. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc. p. 21-38. New York, 1999.
- FILLION, L.; KILCAST, D. Consumer perception of crispness and crunchiness in fruits and vegetables. **Food Qual. and Pref.**, v.13, p. 23-29, 2002.
- FLOWERS, R.S.; ANDREWS, W.H.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed). In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>o</sup>ed. Washington, D.C: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 371-422.
- FOERSTER, S.B., KIZER, K.W., DiSOGRA, L.K., BAL, D.G., KRIEG, B.F., BUNCH, K.L. California's 5 a day for better health campaign: an innovative population-based effort to effect large-scale dietary change. **Am. J. Prevent Med** 11, p. 124-31, 1995.
- FOLEY, D.M.; DUFOUR A.; RODRIGUEZ, L.; CAPORASO, F.; PRAKASH, A. Reduction of *E. coli* O157:H7 in shredded iceberg lettuce by chlorination and gamma irradiation. **Rad. Phys. Chemistry**, v.63, p. 391-396. 2002.
- FOLEY, D.M.; REHER E.; CAPORASO, F.; TRIMBOLI, S.; MUSHERRAF, Z.; PRAKASH, A. Elimination of *L. monocytogenes* and changes in physical and sensory qualities of prepared meal following gamma irradiation. **Food Microbiol.**, v.18, p. 193-204. 2001.

- FOONG, S.C.C.; GONZALEZ, G.L.; DICKSON, J.S. Reduction and survival of *L. monocytogenes* in ready-to-eat meats after irradiation. **J. Food Prot.**, v. 67, n. 1, p. 77-82. 2004.
- FRANCIS, G.A.; O'BEIRNE, D. Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. **Int. J. Food Sci. and Technol.**, v.32, n.2, p. 141-151, 1997.
- FRANCIS, G.A.; THOMAS, C., O'BEIRNE, D. The Microbiological safety of minimally processed vegetables. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 34, n 1, p. 1-22, 1999.
- FRÖDER, H. Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre. São Paulo, 2004. 80p.
- GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZUZERA-COSANO, G. Determination of ready to eat vegetable salad shelf life. **Int. J. Food Microbiol.**, v.36, p. 31-38, 1997.
- GOULARTE, L.; MARTINS, C. G.; MORALES-AIZPURÚA, I. C.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; VIZEU, D. M.; HUTZLER, B. W.; LANDGRAF, M. Combination of minimal processing and irradiation to improve the microbiological safety of lettuce (*Lactuca sativa*, L.). **Rad. Phys. Chem.**, Volume 71, n. 1-2, p. 157-161, 2004.
- HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.19, p.201-207.
- HANOTEL, L.; FLEURIET, A.; BOISSEAU, P. Biochemical changes involved in browning of gamma-irradiated cut witloof chicory. **Postharvest Biology Technol.** V.5, p. 199-210, 1995.
- HARVEY, J., GILMOUR, A. Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced Northern Ireland. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 19, p. 193 – 205, 1993.
- HEISICK, J. E., WAGNER, D. E., NIERMAND; M. L., PEELER, J. T. *Listeria* spp. found on fresh market produce. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1925 – 1927, 1989.
- HITCHINS, A., D. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. **Bacteriological Analytical Manual**. USDA. 2003. [Online] Available: <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>. [15 de outubro de 2003].
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Regular, nonsporulating Gram positive rods. In: Autor Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 1994. 787p.



- HOOVER, D.G. Minimally processed fruits and vegetables: by nonthermal physical treatments. **Food Technol.**, v. 51, n. 6, p. 66 – 71, 1997.
- HOWARD, L.R.; MILLER G.H; WAGNER, A.B. microbiological, chemical and sensory changes in irradiated *Pico de Gallo*. **J. Food Sci.**, v.60, n.3, p. 461-464, 1995.
- KANG, D.H.; FUNG, D.Y.C. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 62, n. 11, p. 1346-1349. 1999.
- KING Jr., A.D.; MAGNUSON, J.A.; TÖRÖK, T.; GOODMAN, N. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **J. Food Sci.**, v.56, n.2, p.459-461, 1991.
- KING, Jr., A.D., BOLIN, H. R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technol.**, v. 43, n. 2, p. 132 – 135, 1989.
- KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C: American public Health Association (APHA), p.69-82, 2001.
- LANDGRAF, M. Fundamentos e perspectivas da irradiação de alimentos visando ao aumento de sua segurança microbiológica. **Tese de livre docência da Fac Ciências Farm da USP**. SP 2002, 85p.
- LIN, C.M., FERNANDO, S.Y., WEI, C. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetables salads. **Food Control**, v. 7, n. 3, p. 135-140, 1996.
- LOAHARANU, P. Irradiation as a cold pasteurization process of food. **Vet. Parasitol.**, v. 64, p.71-82, 1996.
- LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, , 1999 In: MARTH, E. H., RYSER, E.T. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2 nd ed. Marcel Dekker, Inc. p. 131-224. New York, 1999.
- MAN, C.M.D.; JONES, A.A. **Shelf life evaluation of foods**. Blackie Academic and Professional. 1994, 319p.
- MARTINS, C.G; Behrens, J. H., Destro, M. T., Franco, B. D. G. M., Vizeu, D. M., Hutzler, B.; Landgraf, M. Gamma radiation in the reduction of *Salmonella* spp. inoculated on minimally processed watercress (*Nasturtium officinalis*). **Rad. Phys. Chem.**, v. 71, n. 1-2, p. 89-93, 2004a.
- MARTINS, C.G.; CARLOS, R.B.O.; SOUZA, K.L.O.; COSTA-SOBRINHO, P.S.; FRANCO, B.D.G.; DESTRO; M.T.; LANDGRAF, M. Qualidade microbiológica de agrião (*Nasturtium*

- officinalis*) minimamente processado e agrião *in natura*. **Anais do Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Recife. 2004b.
- MARTINS, C.G.; FRODER, H.; SOUZA, K.L.O.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. Ecologia microbiana de vegetais folhosos minimamente processados. **Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia de Alimentos**. Florianópolis. 2003.
- MEAD, G.C.; ADAMS, B.W. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. **Brit. Poultry Sci.**, v. 18, n. 6, p. 661-667, 1977.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCRAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., *et al.*, Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, 5, p. 607-25. 1999.
- MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press. Washington, D.C. 1999.
- MERICAN, Z. Dealing with an expanding global food supply. **J. Food Prot.**, v. 59, n. 10, p. 1133-1137, 1996.
- MOLINS, R.A., Motarjemi, Y., Käferstein, F.K., Irradiation: a critical point in ensuring the microbiological safety of raw foods. **Food Control**, v. 12, p.347-356, 2001.
- NASCIMENTO, M.S.; SILVA, N.; CATANOZI, M.P.L.M.; SILVA, K.C. Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. **J. Food Prot.**, v.66, n.9, p. 1697-1700, 2003.
- NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seed. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 52, p. 123-153, 1999.
- NGUYEN-THE, C., CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutri.**, v. 34, n. 4, p. 371-401, 1994.
- NIEMIRA, B.A. Radiation sensitivity and recoverability of *L. monocytogenes* and *Salmonella* on 4 lettuce types. **J. Food Sci.**, v. 68, n. 9, 2003b.
- NIEMIRA, B.A.; FAN, X.; SOKORAI, K.J.B. Irradiation and modified atmosphere packaging of endive influences survival and regrowth of *L. monocytogenes* and product sensory qualities. **Rad. Phys. Chem.**, v. 72, n. 1, P. 41-48, 2005.
- NIEMIRA, B.A.; FAN, X.; SOKORAI, K.J.B.; SOMMERS, C.H. Ionizing radiation sensitivity of *L. monocytogenes* ATCC 49594 and *L. innocua* ATCC 51742 inoculated on endive (*Chicorium endive*). **J. Food Prot.**, v. 66, n. 6, p. 993-998. 2003a.

- NIEMIRA, B.A.; SOMMERS, C.H; BOYD, G. Irradiation inactivation of four *Salmonella* serotypes in orange juices with various turbidities. **J. Food Prot.**, v. 64, n. 5, p. 615-617. 2001.
- NIEMIRA, B.A.; SOMMERS, C.H; FAN, X. Suspending lettuce type influences recoverability and radiation sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, v. 65, n. 9, p. 1388-1393. 2002.
- NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *L. monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v.61, n.2, p.244-248, 1998.
- O'CONNOR-SHAW, R.E., ROBERTS, R., FORD, A.L., NOTTINGHAM, S.M. Shelf life of minimally processed honeyclew, kiwifruit, papaya, pineapple and cantaloupe. **J. Food Sci.**, v. 59, n. 6, p. 1202-1215, Chicago, 1994.
- PALÚ, A.P.; TIBANA, A.; TEIXEIRA, L.M.; LEMOS-MIGUEL, M.A.; PYRRHO, A.S.; LOPES, H.R. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas servidas em restaurantes “self-service” privados, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Hig. Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p. 67-74, 2002.
- PORTO, E.; UBALDI-EIROA, M.N. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy, Food Environ. Sanit.**, Ames, v.21, n.4, 2001.
- PRAKASH, A., GUNER, A. R., CAPORASO, F., FOLEY, D. M. Effects of low-dose gamma irradiation on the shelf life and quality characteristics of cut romaine lettuce packaged under modified atmosphere. **J. Food Sci.**, v. 65, n. 3, p. 549 – 553, 2000a.
- PRAKASH, A., INTHAJAK, P.; HUIBREGTSE, H., CAPORASO, F., FOLEY, D. M. Effects of low-dose gamma irradiation and conventional treatments on shelf life and quality characteristics of diced celery. **J. Food Sci.**, v. 65, n. 6, p. 1070 – 1075, 2000b.
- RAGAERT, P.; VERBEKE, W.; DEVLIEGHIERE, F.; DEBEVERE, J. Consumers perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. **Food Qual. and Pref.**, v. 15, p. 259-270, 2004.
- RAJKOWSKI, K. T. & THAYER, D. W. Reduction of *Salmonella* spp. and strains of *Escherichia coli* O157:H7 by gamma radiation of inoculated sprouts. **J. Food Prot.**, v. 63, p. 871-875, 2000.
- ROCOURT, J. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2 nd ed. Marcel Dekker, Inc. p. 1-20. New York, 1999.
- ROLLE, R.S., CHISM, G.W. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **J. Food Qual.**, v. 10, p. 187-193, 1987.

- ROSA, O.O., CARVALHO, E.P. Características microbiológicas de frutos e hortaliças minimamente processados. **Bol. Soc. Bras. Cienc., Tecnol. Alim.**, v. 34, n. 2, p. 84 – 92, 2000.
- SIZMUR, K. & WALKER, C.W. *Listeria* in prepared salads. *Lancet* 1, 8595: 1167. 1988.
- SLUTSKER, L., SCHUCHAT, A. Listeriosis in Humans. In: MARTH, E. H., RYSER, E.T. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2 nd ed. Marcel Dekker, Inc. p. 75-95. New York, 1999.
- SOMMERS, C. H., THAYER, D. W. Survival of surface inoculated *Listeria monocytogenes* on commercially available frankfurters following gamma irradiation. **J. Food Saf.**, v. 20, p. 127-137, 2000.
- SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. **Food Microbiol.**, v.18, p. 159-163, 2001.
- STEINBRUEGGE, E.G., MAXCY, R.B., LIEWN, M. B. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. **J. Food Prot.**, v. 51, n. 08, p.596 – 599, 1998
- SZABO, E.A.; SCURRAH, K.J.; BURROWS, J.M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 456-460, 2000.
- TAPIA, M.S., DÍAZ, R.V., MARTÍNEZ, A. Microbial ecology of spoilage and pathogenic flora associated to fruits and vegetables. In: ALZAMORA, S.M., TAPIA, M.S., LÓPEZ-MALO, A. **Minimally processed fruits and vegetables. Fundamental aspects and applications**. Aspen Publication. Maryland, 2000.
- TEUFEL, P. & BENDZULLA, C. Bundesweit Erhebung zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in **Lebensmittel**. **Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin** (BgVV), 14195. Berlin, Germany. 1994. *Apud*: NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 61, n. 02, p. 244 – 248, 1998.
- THAYER, D.W.; RAJKOWSKI, K.T. Development in irradiation of fresh fruits and vegetables. **Food Technol.**, v.53, n.11, p. 62-65, 1999.
- THAYER, Jr., D.W., BOYD, G., FOX, J.B., LAKRITZ, L., HAMPSON, J.W. Variations in radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with the suspending meat. **J. Food Sci.**, v. 60, n. 1, p. 63-67, 1995.
- THAYER, Jr., D.W., BOYD, G., KIM, A., FOX, J.B. FARREL, H.M. Fate of gamma-irradiated *L. monocytogenes* during refrigerated storage on raw cooked turkey breast meat. **J. Food Prot.**, v. 61, n. 8, p. 979-987, 1998.

- TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.**, v.13, n.14, p.309-315, 1982a.
- TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILi – um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.**, v.13, n.3, p.230-235, 1982b.
- US: Code of Federal Regulations, CFR title 21, Part 179, sub. Part C 179.45, 1985.
- VILLANEUVA, N.D.M.; PETENATE, A.J., SILVA. Performance of three affective methods and diagnosis of the ANOVA model. **Food Qual. and Pref.**, v. 11, p. 367-370, 2000.
- YU, L., REITMEIER, CA, LOVE, M.H. Strawberry texture and pectin content as affected by electron beam irradiation. **J. Food Sci.**, v. 61, n. 4, p. 844 – 846, 1996.
- ZHANG, S., FARBER, J.M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh cut vegetables. **Food Microbiol.**, v. 13, p. 311-321, 1996.

## ANEXO I

### CADASTRO DE PROVADORES

#### ANÁLISE SENSORIAL DE ALIMENTOS

Estamos selecionando pessoas para participar de uma equipe de provadores de alface irradiada, que avaliará a aparência, o sabor, o aroma e a textura (consistência, maciez, etc) do produto e dará a sua opinião sobre ele. O dados serão mantidos em sigilo e você terá total liberdade em desistir da equipe de provadores.

As análises ocorrerão em data a definir, de dois em dois dias. Se você estiver interessado em participar voluntariamente, por favor, preencha o questionário abaixo.

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Telefone para contato/ramal: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

1. Sexo

( ) masculino      ( ) feminino

2. Idade (faixa etária):

- ( ) 21 – 25 anos
- ( ) 26 – 30 anos
- ( ) 31 – 34 anos
- ( ) 35-44anos
- ( ) 45-54 anos
- ( ) Acima de 55 anos

3. Grau de escolaridade:

- superior incompleto
- superior completo
- segundo grau (colegial)
- primeiro grau

4. Existe algum dia ou horário de preferência para participar das sessões de degustação?  
Explique.

---

---

5. Com que frequência você consome alface:

- diariamente
- de 2 a 5 vezes por semana
- 1 vez por semana
- ocasionalmente (menos de 1 vez por semana, na média)
- nunca experimentei

6. Em caso de já ter experimentado alface, indique na escala abaixo o quanto você gosta ou desgosta deste produto:

- 9- Gosto muitíssimo
- 8- Gosto muito
- 7- Gosto moderadamente
- 6- Gosto ligeiramente
- 5- Indiferente
- 4- Desgosto ligeiramente
- 3- Desgosto moderadamente
- 2- Desgosto muito
- 1- Desgosto muitíssimo

7. Você tem alguma restrição em comer alface? Explique.

Sim     Não

---

---

8- Você passa no momento por algum problema de saúde?

sim     não

Em caso positivo,

especifique: \_\_\_\_\_

---

9- Está fazendo uso de algum medicamento?

sim     não

Em caso positivo,

especifique: \_\_\_\_\_

---

10- Está fazendo algum tipo especial de dieta?

sim     não

Em caso positivo,

especifique: \_\_\_\_\_

---

11- É gestante?

sim     não

12- É fumante?

sim     não



**Termo de consentimento:**

Compreendi os objetivos do teste descrito nesta ficha; as informações por mim aqui prestadas são verdadeiras e autorizo os responsáveis pela condução do referido teste a utilizar estas informações na seleção de provadores.

São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

---

Assinatura do candidato

R.G.:

**ANEXO 2**

Modelos matemáticos para a alface Americana testemunha e para a irradiada com 1,5 kGy, obtida através de regressão linear

$$A_{AI} = -0,5088t + 7,5233$$

$$r^2 = \text{SQ}_{\text{Regressão}} / \text{SQ}_{\text{Total}} = 0,27$$

$$A_{AT} = -0,4788t + 8,5783$$

$$r^2 = \text{SQ}_{\text{Regressão}} / \text{SQ}_{\text{Total}} = 0,26$$

Sendo:

$A_{AI}$ : Aceitação da alface Americana Irradiada (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

$A_{AT}$ : Aceitação da alface Americana Testemunha (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

t: tempo (dias)

### ANEXO 3

Análise de variância da regressão linear para a alface Americana irradiada com 1,5 kGy

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(3)	(255,36)	
Regressão	1	255,12	0,001
Resíduo da Regressão	134	691,83	
Falta de ajuste	2	0,24	0,977
Erro Puro	132	691,59	
Total	135	946,95	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade

#### ANEXO 4

Análise de variância da regressão para a alface Americana testemunha

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(3)	(247,43)	
Regressão	1	225,59	0,001
Resíduo da Regressão	134	649,10	
Falta de ajuste	2	21,84	0,104
Erro Puro	132	627,26	
Total	135	874,69	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade

## ANEXO 5

Modelos matemáticos para a alface Crespa testemunha e para a irradiada, obtida através de regressão linear.

$$A_{CI} = 7,33 - 0,620t + 0,142t^2 - 0,00972 t^3 \quad r^2 = SQ_{Regressão}/SQ_{Total} = 0,23$$

$$A_{CT} = 7,23 - 0,459t + 0,153t^2 - 0,0122 t^3 \quad r^2 = SQ_{Regressão}/SQ_{Total} = 0,31$$

Sendo:

$A_{CI}$ : Aceitação da alface Crespa Irradiada (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

$A_{CT}$ : Aceitação da alface Crespa Testemunha (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

t: tempo (dias)

## ANEXO 6

Análise de variância da regressão linear para a alface Crespa irradiada com 1,5 kGy

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(5)	(255,866)	0,001
Regressão	3	233,005	0,001
Resíduo da Regressão	181	796,090	
Falta de ajuste	2	44,557	0,006
Erro Puro	179	751,533	
Total	184	1029,095	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade

## ANEXO 7

Análise de variância da regressão para a alface Crespa testemunha

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(5)	(461,829)	0,001
Regressão	3	430,97	0,001
Resíduo da Regressão	181	947,61	
Falta de ajuste	2	47,72	0,010
Erro Puro	179	899,89	
Total	184	1378,58	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade

## ANEXO 8

Modelos matemáticos para a alface Lisa testemunha e para a irradiada, obtida através de regressão linear.

$$A_{LI} = -0,360t + 0,0250t^2 + 6,9152 \quad r^2 = SQ_{Regressão}/SQ_{Total} = 0,042$$

$$A_{LT} = 7,85 - 1,21t + 0,0692t^2 \quad r^2 = SQ_{Regressão}/SQ_{Total} = 0,44$$

Sendo:

$A_{LI}$ : Aceitação da alface Lisa Irradiada (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

$A_{LT}$ : Aceitação da alface Lisa Testemunha (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

t: tempo (dias)



## ANEXO 9

Análise de variância da regressão linear para a alface Lisa irradiada com 1,5 kGy

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(4)	(37,713)	0,154
Regressão	2	35,412	0,047
Resíduo da Regressão	143	809,576	
Falta de ajuste	2	2,696	0,790
Erro Puro	141	806,880	
Total	145	844,988	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade

## ANEXO 10

### Análise de variância da regressão para a alface Lisa testemunha

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(4)	(633,646)	0,001
Regressão	3	599,88	0,001
Resíduo da Regressão	143	772,64	
Falta de ajuste	2	42,65	0,018
Erro Puro	141	729,99	
Total	145	1372,53	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade

## ANEXO 11

Modelos matemáticos para a alface Crespa roxa testemunha e para a irradiada, obtida através de regressão linear.

$$A_{RI} = -0,533 + 7,13t \quad r^2 = \text{SQ}_{\text{Regressão}}/\text{SQ}_{\text{Total}} = 0,34$$

$$A_{RT} = 8,70 - 0,845t \quad r^2 = \text{SQ}_{\text{Regressão}}/\text{SQ}_{\text{Total}} = 0,55$$

Sendo:

$A_{RI}$ : Aceitação da alface Crespa roxa Irradiada (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

$A_{RT}$ : Aceitação da alface Crespa roxa Testemunha (pontuada na escala hedônica não estruturada de 10 pontos)

t: tempo (dias)

## ANEXO 12

Análise de variância da regressão linear para a alface Crespa roxa irradiada com 1,5 kGy

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(4)	(504,939)	0,001
Regressão	2	473,01	0,001
Resíduo da Regressão	149	907,46	
Falta de ajuste	2	20,36	0,189
Erro Puro	147	887,10	
Total	151	1380,47	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade

### ANEXO 13

Análise de variância da regressão para a alface Crespa roxa testemunha

Fonte de variação	GL <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
(Tempo)	(4)	(1141,779)	0,001
Regressão	1	1107,3	0,001
Resíduo da Regressão	150	786,4	
Falta de ajuste	3	36,6	0,071
Erro Puro	147	749,8	
Total	151	1893,7	

<sup>a</sup>: Graus de liberdade, <sup>b</sup>: Soma de Quadrados, <sup>c</sup>: probabilidade