

677
34266

MURILLO FREIRE JUNIOR

EFEITO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO E INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA MODIFICADA NA QUALIDADE DO ALFACE HIDROPÔNICO cv. REGINA MINIMAMENTE PROCESSADO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador
Prof. Dr. Adimilson Bosco Chitarra

Co-orientador
Prof. Dr. Charles Frederick Robbs

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



48677

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA

N.º CLAS. T664.80552

FRE

N.º REGISTRO

48677

DATA

11.1.05.100

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
1999

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Freire JR., Murilo

**Efeito da temperatura de armazenamento e da atmosfera modificada
na qualidade do alface hidropônico cv. Regina minimamente processado
/ Murilo Freire Junior. – Lavras, 1999.**

120 p.: il.

Orientador: Adimilson Bosco Chitarra.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

**1. Produto minimamente processado. 2. Alface. 3. Atmosfera
modificada. 4. Qualidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

CDD-664.80552

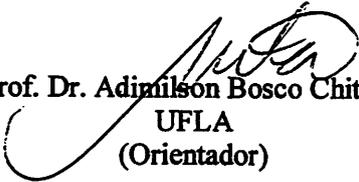
MURILLO FREIRE JUNIOR

**EFEITO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO E
INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA MODIFICADA NA QUALIDADE DO
ALFACE HIDROPÔNICO cv. REGINA MINIMAMENTE
PROCESSADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para
obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 14 de dezembro de 1999

Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Prof. Dr. Rolf Puschmann	UFViçosa
Prof. Dr. Charles Frederick Robbs	EMBRAPA


Prof. Dr. Adimilson Bosco Chitarra
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Dóra e Murillo,

Aos meus filhos, Nathália André e Victor,

por tudo que representam para mim.

OFEREÇO

À minha namorada Lourdes, amiga e companheira,
pelo carinho, incentivo e incansável apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e proteção.

À EMBRAPA, pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Adimilson B. Chitarra pela orientação, amizade, apoio e incentivo.

Ao Prof. Charles F. Robbs, pela orientação e ensinamentos.

À Profª Maria Isabel F. Chitarra, pela colaboração e incentivo.

À Coordenadora de Pós-Graduação do Departamento de Ciência dos Alimentos, Profª. Eliana Pinheiro, pelo apoio e amizade.

Aos colegas da EMBRAPA, em especial aos amigos Vieira, Hilda, Ânia, Ana Bittencourt, Servílio, Esdras, Antônio Gomes, Rozires e Cláudio pelo apoio e cooperação. Aos demais colegas Ronoel, Neide, Maria de Lourdes, Mávia, Patrícia e Luís Antônio.

Aos estagiários da EMBRAPA, Ednilton e Renata, pela ajuda nas análises microbiológicas.

Aos Srs. Hiroshi e Marcelo Watanabe (MHW Produtos de Plasticultura Hidroponia), pela doação da matéria prima.

Ao Sr. Mario Tanaka (Da Roça), pela doação das embalagens.

À Sandra e Tina, pelo apoio nas análises laboratoriais.

Ao Enilson, pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos colegas de curso, em especial a Leimi, Sonia e Josivan pelo convívio e cooperação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO	4
1 Aspectos de mercado	4
2 Fatores relacionados à qualidade, vida útil e processamento	7
2.1 Cultivares e maturação ..	7
2.2 Temperatura	11
2.3 Atmosfera modificada	12
3 Aspectos fisiológicos e bioquímicos	19
3.1 Indução da respiração e do etileno pelo fermento	19
3.2 Escurecimento enzimático	22
3.3 Ação da temperatura e da atmosfera modificada	26
4 Aspectos microbiológicos	28
4.1 Fatores de influência	28
4.2 Microbiota	30
4.3 Ação da temperatura e da atmosfera modificada	34
4.4 Sanificação	38
5 Hidroponia	40

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Procedência e seleção da amostra	43
3.2 Metodologia	43
3.2.1 Processamento	43
3.2.2 Avaliações físico-químicas, químicas e bioquímicas	45
3.2.3 Avaliação sensorial	48
3.2.4 Avaliação microbiológica	51
3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Acidez	54
4.2 pH	55
4.3 Dióxido de carbono (CO ₂)	57
4.4 Clorofila total	59
4.5 Polifenoloxidase (PFO)	61
4.6 Fenilalanina amônia-liase (FAL)	63
4.7 Correlação entre as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas	66
4.8 Avaliação sensorial	68
4.8.1 Cor	68
4.8.2 Frescor	70
4.8.3 Escurecimento da nervura central	71
4.8.4 Escurecimento das bordas	73
4.8.5 Cozido	75
4.8.6 Podre	76
4.8.7 Impressão global da aparência	78
4.9 Correlação entre as variáveis sensoriais	79
4.10 Correlação entre as variáveis sensoriais e as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas	80

4.11 Avaliações bacteriológicas	82
4.11.1 Contagem total, de enterobactérias e de pseudomonas	82
4.11.2 Identificação das bactérias	86
CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	109

RESUMO

FREIRE JR., Murillo. **Efeito da temperatura de armazenamento e da atmosfera modificada na qualidade do alface hidropônico cv. Regina minimamente processado.** Lavras: UFLA, 1999. 120p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).

A produção de frutas e hortaliças minimamente processadas tem como objetivo entregar ao consumidor um produto fresco, com maior vida útil, garantindo ao mesmo tempo, a segurança alimentar e a manutenção da qualidade do produto. O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações físico-químicas, químicas, bioquímicas, sensoriais e microbiológicas em alface hidropônico minimamente processado, cv. Regina, acondicionado em sacos plásticos hermeticamente selados e armazenados à 2°C e 10°C. Para ambas temperaturas de armazenamento, não houve nenhum comprometimento do produto com qualquer um dos aspectos de qualidade analisados, até o terceiro dia. O alface hidropônico minimamente processado, armazenado à 2°C, apresentou uma vida útil de 7 dias, sem comprometer suas principais características físicas, físico-químicas, químicas, bioquímicas e sensoriais, além de reduzir o crescimento de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes. Para o produto armazenado à 10°C, a vida útil foi de no máximo 3 dias. À temperatura de armazenamento de 10°C, permitiu após sete dias, o crescimento de bactérias psicotróficas patogênicas, as quais, em níveis mais elevados, podem ser prejudiciais à saúde humana. As práticas utilizadas de higiene e sanificação reduziram, mas não foram suficientes, para eliminar todas as bactérias deteriorantes/patogênicas presentes endógenas e/ou exógenas ao produto.

Comitê Orientador: Adimilson Bosco Chitarra - UFLA (Orientador), Charles Frederick Robbs - Embrapa, José da Cruz Machado - UFLA, Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA e Rolf Puschmann - UFV.

ABSTRACT

FREIRE JR., Murillo. Effect of the storage temperature and modified atmosphere on the quality of minimally processed hydroponic lettuce cv. Regina. Lavras: UFLA, 1999. 120p. (Thesis – Doctor 's degree in Food Science).

The production of minimally processed fruits and vegetables has as objective to offer to the consumer a fresh product, with longer shelf life and guaranteeing at the same time, the alimentary safety and the maintenance of the quality of the product. The aim of this work was to evaluate some physical-chemical, chemical, biochemical, sensorial and microbiological alterations in minimally processed hydroponic lettuce, cv. Regina, paked in thermically sealed plastic bags stored at 2°C and 10°C. For both storage temperatures, there was not any damage of the product with any of the quality aspects analyzed, until the third day. The minimally processed hydroponic lettuce stored at 2°C presented a shelf life of 7 days without harming its main quality characteristics, besides reducing the deteriorating bacteria is growth. For the product stored at 10°C the shelf life was up to 3 days. At the storage temperature of 10°C it allowed, after seven days the pathogenic bacteria to grow, which at higher levels, can be harmful to the human health. The used practices of hygiene and sanitation reduced, although not sufficiently to eliminate, all the pathogenic endogenous and/or exogenous bacteria present in the product.

Guidance Committee: Adimilson Bosco Chitarra - UFLA (Major Professor), Charles Frederick Robbs – Embrapa, José da Cruz Machado - UFLA, Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA and Rolf Puschmann - UFV.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os consumidores vêm apresentando maior consciência na escolha de sua alimentação, porém com menor tempo disponível para preparar refeições saudáveis. Como resultado, o mercado e a demanda por frutas e vegetais levemente processados têm aumentado rapidamente, proporcionando o surgimento de produtos convenientes, ou seja, produtos frescos que podem ser preparados e consumidos em pouco tempo¹ (Burns, 1995).

Muitos sinônimos são usados para o termo levemente processado, incluindo minimamente processado, parcialmente processado ou ligeiramente processado. Produtos levemente processados também são denominados pré-ortados, pré-preparados, semi-elaborados, convenientes e produtos com valor agregado² (Cantwell, 1992).

O termo frutas e hortaliças minimamente processadas é geralmente definido como produtos que contêm tecidos vivos ou aqueles que foram somente levemente modificados em suas condições iniciais, aparentando frescor e mantendo sua qualidade. Estes tecidos não apresentam as mesmas respostas fisiológicas do que o produto não tratado e inteiro, com diferentes respostas ao meio ambiente e às condições de embalagem³ (Wiley, 1994).

⇒ O segmento do consumo institucional, representado por cozinhas industriais, hospitais, panificadoras, restaurantes, lanchonetes e companhias de distribuição, constitui-se importante canal de vendas, tratando-se de um público alvo.

BURNS, J.K. Lightly processed fruits and vegetables: introduction to the colloquium. *HortScience*, v.30, n.1, p.14, 1995.

CANTWELL, M. Postharvest handling systems. Minimally processed fruits and vegetables. p.277-281. In: A.A.Kader (ed). *Postharvest technology of horticultural crops*. 2nd ed. Univ. of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Davis. Publ. 3311. 1992.

Estes compradores industriais exigem uniformidade na qualidade do produto, rigorosos padrões de higiene, tempo de preparação mínimo e pequenas quantidades de resíduos⁴ (Hobson e Tucker, 1996).

⇒ Seguindo uma tendência mundial, muitos consumidores brasileiros (recém-casados, descasados ou solteiros e até mesmo famílias com pouco tempo disponível, além de um maior número de mulheres trabalhando fora de casa e pessoas morando sozinhas) resolveram utilizar pratos semiprontos e vegetais pré-cortados. Os supermercados estão ampliando cada vez mais as seções deste tipo de produto. No Brasil, este nicho de mercado começou a ser explorado em 1994 e em apenas um ano cresceu 68,9% em volume consumido no varejo do país e em 1996 movimentou cerca de R\$ 400 milhões em vendas, segundo dados da consultoria Nielsen⁵ (Jornal do Brasil, 21/06/97).

O alface (*Lactuca sativa*, L.) é considerada uma das hortaliças folhosas mais importante na alimentação do brasileiro, o que assegura à cultura expressiva importância econômica. A hidroponia permite seu cultivo durante o ano todo, obtendo-se grande produtividade, com melhor qualidade e sem o risco de elevada contaminação de microrganismos veiculados pelo solo. O fornecimento dos nutrientes às raízes é feito via água, sem o uso do solo.

Para o alface cultivado no sistema de hidroponia, não há informações disponíveis sobre o seu comportamento após o processamento, especialmente quanto aos seus aspectos fisiológicos e microbiológicos. Portanto, informações devem ser geradas para este tipo de produto, visando desenvolver uma tecnologia de processamento mínimo mais adequada a ser utilizada pela indústria e por agricultores e empresários em geral.

³ WILEY, R.C. (Ed.) Minimally processed refrigerated fruits & vegetables. Chapman & Hall, Inc. New York. p.1-15. 1994.

⁴ HOBSON, G.E. & TUCKER, W.G. Lightly-processed horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*, v.9, p.113-114, 1996.

⁵ JORNAL DO BRASIL, em 21/06/97- 1º Caderno - p.17

Seleção de variedades, monitoramento da temperatura, garantia da qualidade, sanificação, segurança alimentar e aumento da sua vida útil são características ainda pouco conhecidas em produtos minimamente processados.

Este trabalho tem o objetivo de verificar o efeito da temperatura de armazenamento e da atmosfera modificada sobre algumas características físico-químicas, químicas, bioquímicas, sensoriais e as microbiológicas do alface hidropônico minimamente processado para obter informações que permitam preservar a qualidade e atender a segurança alimentar do produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo serão abordados os principais fatores envolvidos na produção de frutas e hortaliças minimamente processadas, tais como: mercado, aspectos fisiológicos, aspectos microbiológicos, embalagem e hidroponia.

2.1 Aspectos de mercado

Com a mudança do estilo de vida, o consumidor tornou-se mais exigente de produtos de excelente qualidade, novas variedades de frutas e hortaliças, itens especiais e produtos de conveniência prontos para uso, existindo uma crescente tendência para a rapidez e simplificação na elaboração dos alimentos por parte dos consumidores (Resurreccion e Prussia, 1986; Ronk, Carson e Thompson, 1989; King, Jr. e Bolin, 1989). O crescimento da popularidade de produtos prontos para consumo nos supermercados é o resultado direto do desejo do consumidor em conveniência e sua percepção em frescor nestes produtos (Gaynor, 1989). Segundo Crothers (1992), o negócio com pré-cortados está crescendo. No início, o maior interesse era institucional, entretanto, atualmente há tendência real para itens de conveniência nos supermercados.

Em 1981, existiam, nos Estados Unidos, 133 opções distintas de frutas e hortaliças nos supermercados, 282 opções em 1993 e 340 em 1995 (Cook, 1997). Na atualidade, o segmento de minimamente processados representa 10% do total das frutas e hortaliças comercializadas (Gorny, 1997), e as vendas de pré-cortados foram projetadas para um aumento de 5,8 bilhões de dólares em 1994 para 19 bilhões em 1999 (Hodge, 1995). Outro aspecto que tem contribuído fortemente para este crescimento é a expansão dos serviços de

omida rápida, restaurantes e serviços de companhias de aviação que requerem produtos pré-preparados, mas de qualidade uniforme para simplificar suas operações junto ao consumidor.

Alguns economistas têm estimado que nos Estados Unidos, mais de 10% do volume de dólares gerados pelo departamento de produção dos supermercados podem ser, até o final do século proveniente de frutas e hortaliças pré-cortadas (Graziano, 1993). Para o ano 2000, a sua produção poderá chegar a 8 bilhões de dólares (Zind, 1990). O número de fabricantes de vegetais pré-cortados está crescendo bem como a variedade de produtos. O maior indicador para a projeção deste crescimento está no aumento da área disponível nos supermercados para saladas de frutas e hortaliças embalados que facilitam o consumo doméstico. As projeções serão alcançadas, dependendo diretamente da aplicação da higiene na fabricação, do desenvolvimento da tecnologia de embalagem e da manutenção correta de baixas temperaturas na cadeia de frio desde a distribuição, armazenagem, manuseio e uso pelo consumidor. O sucesso dependerá da obtenção de alimentos seguros, com qualidade semelhante à de produtos frescos disponíveis na mesa do consumidor (Schlimme, 1995). Para atender a este consumidor e satisfazer esta demanda, novas técnicas têm sido desenvolvidas pelas indústrias de processamento de alimentos (Hobson e Tucker, 1996).

A obtenção dos produtos hortícolas minimamente processados ou pré-cortados envolve operações de lavagem, descascamento, aparamento, corte, embalagem e armazenamento dos produtos frescos, visando conferir higiene, conveniência, rapidez no preparo e, mais freqüentemente, produtos prontos para servir (Hobson e Tucker, 1996).

Nos Estados Unidos, a elaboração de produtos pré-cortados é realizada por empresas localizadas próximas à área de produção, que utilizam matérias-primas de melhor qualidade e são distribuídas nacionalmente a mais de 4 mil

quilômetros de distância, possibilitando uma vida útil de 14 dias. Os fabricantes regionais, que atendem a uma demanda específica, recebem a matéria prima 4 a 7 dias após a colheita, na hora da preparação, e dispõem de apenas 7 dias para a comercialização (Watada, Ko e Minott, 1996).

Em países como Estados Unidos e Inglaterra, estima-se que mais de 70% dos alimentos que entram nas cozinhas domésticas passaram por algum processamento. As pesquisas demonstram que o tempo destinado à preparação de refeições domésticas está caindo, enquanto restaurantes e lanchonetes continuam a crescer em popularidade (Hobson e Tucker, 1996).

A grande aceitação dos produtos minimamente processados em restaurantes e instituições deve-se à ausência da necessidade de lavagem, aparagem ou corte das frutas e hortaliças. Além disso, os custos de transporte são reduzidos pois o material de descarte, muitas vezes maior do que 40-50%, é removido antes (Bolin et al., 1977; McDonald, Risse e Barmore, 1990). Um outro aspecto importante no desenvolvimento da indústria de pré-cortados está relacionado com o seu potencial para criar um grande número de empregos para trabalhadores horistas (Zagory, 1997).

A chave do sucesso nas vendas de produtos frescos minimamente processados poderá ser a oferta constante de produtos uniformes de alta qualidade (How, 1990). A baixa qualidade dos produtos poderá afetar a confiança dos consumidores e diminuir o crescimento do mercado (Zagory, 1997).

Segundo Schlimme (1995), os parâmetros usados para a comercialização de frutas e hortaliças minimamente processadas são: o controle de temperatura, o retardamento na perda de umidade, a alteração da composição da atmosfera ao redor do produto, a embalagem e o controle microbiológico do produto. O alto nível na qualidade sensorial é um requisito importante para o sucesso na comercialização de frutas e hortaliças minimamente processadas.

Assim, a manutenção do produto na temperatura adequada imediatamente após a colheita, durante a sua distribuição e até o seu consumo, é o fator mais importante na obtenção de frutas e hortaliças minimamente processadas (Schlimme, 1995).

2.2 Fatores relacionados à qualidade, vida útil e processamento

2.2.1 Cultivares e maturação

⇒ Todos as frutas e hortaliças minimamente processadas são perecíveis e demonstram rápida deterioração na qualidade pós-colheita sob armazenamento ambiente. Estes produtos são mais perecíveis do que os produtos frescos não processados devido aos danos nos tecidos resultantes das operações do processamento. Estes danos físicos aumentam a respiração e a produção de etileno em minutos, que associados, aumentam as taxas de outras reações bioquímicas responsáveis por mudanças na cor, odor, textura e qualidade nutricional (Cantwell, 1992).

Muitos fatores influenciam a qualidade de frutas e hortaliças minimamente processadas, incluindo as condições de cultivo e práticas culturais, cultivar e maturidade na colheita, métodos de colheita e manuseio, padrões de inspeção e duração e condições de armazenamento. Um sistema de manuseio integrado confere maior controle nos fatores de qualidade (Shewfelt, 1987; Allen e Pierson, 1988).

Sinais de murchamento são o defeito principal na qualidade de vegetais folhosos (Yano, Kojima e Torikata, 1981). A natureza da demanda por produtos minimamente processados requer que eles sejam visualmente aceitáveis, com

aparência de frescos, tenham qualidade uniforme fora da embalagem e sejam razoavelmente livres de defeitos (Cantwell, 1992).

Um fator importante na obtenção de frutas e hortaliças minimamente processadas está relacionado à cultivar ou variedade. A seleção de variedade que apresentem um maior tempo de vida útil pode ser importante. Tal seleção pode incluir mutantes ou vegetais geneticamente modificados com amadurecimento mais lento, melhor retenção da textura ou melhores características de sabor e odor (Romig, 1995).

Segundo López-Gálvez, Satveit e Cantwell, (1996a), embora o alface tipo Iceberg seja predominantemente usado na preparação de saladas, outros tipos estão agora sendo usados em saladas mistas. Informações sobre o comportamento pós-colheita destes outros tipos de alface não existem e são necessárias especialmente visando a sua qualidade em embalagens de saladas prontas.

A qualidade e a vida útil do alface minimamente processado varia dependendo da cultivar, condições culturais ou fatores pré-colheita, maturidade, procedimentos no processamento e condições de armazenamento como temperatura, concentrações de O₂ e de CO₂ e concentração de etileno (Bolin e Huxsoll, 1991 e Bolin et al., 1977).

O modo de preparo do alface minimamente processado pode ter um grande efeito na qualidade e na vida de armazenamento, devido as diferenças na quantidade de danos causados. A estabilidade do alface é afetada pela maneira como é cortado. O uso de lâminas afiadas duplica o seu tempo de vida útil se comparado com o corte usando facas cegas (Bolin et al., 1977; Bolin e Huxsoll, 1991 e Cantwell, 1995). A redução do tamanho do corte também reduz a vida de armazenamento do alface. O fatiamento do tecido que resulte em menor exsudação da seiva celular aumenta a vida de armazenamento quando comparado ao corte em pedaços (Bolin et al., 1977). Não somente a quantidade

le cortes, mas também a direção do corte afeta a deterioração de frutas e hortaliças minimamente processadas (Zhou, Abe e Zwata, 1992).

⇒ A lavagem é importante para a remoção do fluido celular que cobre o produto após o fatiamento. Este fluido celular contém sistemas enzimáticos muito ativos. Quando catecol foi adicionado à superfície do alface picado, ocorreu um rápido escurecimento, indicando a presença de polifenoloxidase. Estes sistemas enzimáticos ativos podem explicar a rápida deterioração do alface, se este material, que é liberado durante o corte, não for removido da superfície através de lavagem (Bolin et al., 1977).

A maturidade na colheita das frutas e hortaliças é um fator que afeta o processamento e a qualidade do produto (Shewfelt, 1993). O alface cortado para saladas frescas apresentará o nível de qualidade desejado somente se o processamento for realizado em local próximo ao ponto de consumo (Huxsoll e Bolin, 1989).

Vários tratamentos químicos para imersão de vegetais são descritos na literatura. Foram testadas misturas de fosfato de cálcio, fosfato de sódio, fosfato tribásico de sódio, pirofosfato tribásico de sódio e bissulfito, mas não apresentaram vantagem alguma para o produto. A vida útil do alface cortado não foi aumentada pela aplicação de diferentes tratamentos incluindo sulfito, cloro e soluções de fosfato de cálcio (Bolin et al., 1977). Estes resultados estão de acordo com as observações de Priepke, Wer e Nelson (1976), que concluíram que tratamentos químicos não apresentam, em geral, valor algum. } A lavagem para remover o conteúdo celular livre que é liberado pelo corte é um importante aspecto para prolongar a vida útil do alface cortado, mas a lavagem pode ser realizada com água pura, sem necessidade de adição de preservativos. }

Bolin e Huxsoll (1991) utilizaram soluções de ácido cítrico, cloreto de cálcio e cloreto de zinco em banhos de imersão para prolongar a vida útil do alface cortado e não obtiveram resultado efetivo.

O tempo máximo de vida útil do alface cortado em plantas processadoras para saladas ou uso em sanduíches e vendidos em sacos plásticos é de 2 a 3 semanas, dependendo do processamento, embalagem e condições de armazenamento. A vida útil está relacionada com a fisiologia do alface e a microbiota presente (King e Bolin, 1989).

A taxa de evaporação em tecidos de frutas e hortaliças minimamente processadas é drasticamente aumentada pela exposição do interior dos tecidos cortados à atmosfera externa, devido a redução da pressão de vapor da água. Impedir a dessecação na superfície do tecido cortado é um aspecto crítico na manutenção da qualidade visual e aceitabilidade de alguns produtos (Brecht, 1995). Entretanto, para a maioria das frutas e hortaliças minimamente processadas, a centrifugação ou outros procedimentos são recomendados para a completa remoção da água e leve dessecação da superfície, com o objetivo de reduzir o crescimento microbiano (Cantwell, 1992). Herner e Krahn (1973) verificaram que se a superfície do alface for deixada úmida, o seu tempo de armazenamento é reduzido drasticamente.

⇒ Em resumo, alguns fatores são críticos para a manutenção da qualidade e da vida útil de frutas e hortaliças minimamente processadas. O uso de matéria prima de excelente qualidade, a redução do dano mecânico antes do processamento, o corte usando lâminas afiadas, o enxágüe das superfícies cortadas para remover os nutrientes celulares liberados, a centrifugação para remover completamente a água e causar ligeiro ressecamento, a embalagem mantida sob ligeiro vácuo e a manutenção da temperatura do produto a 1 ou 2°C durante o armazenamento e manuseio são os aspectos principais para a obtenção de produtos com qualidade.

.2.2 Temperatura

Temperatura e umidade são necessários para manter a integridade da maioria das hortaliças. Quando altas temperaturas e baixa umidade prevalecem, ocorre rápida transpiração e os vegetais murcham. Sob estas condições a perda de vitamina C e caroteno em vegetais folhosos foi maior que 50% (Ezell e Wilcox, 1959; 1962).

⇒ O controle da temperatura é a técnica disponível mais usual e importante para a minimização dos efeitos do ferimento em frutas e hortaliças minimamente processadas. As reações metabólicas nos produtos íntegros são reduzidas de duas a três vezes para cada 10°C de redução na temperatura. O aumento nas taxas de respiração e produção de etileno, bem como outras reações associadas ao ferimento, são minimizadas quando os produtos frescos são processados em temperaturas baixas. O enxágüe com água fria seguido do processamento pode ser benéfico para diminuir e ajudar a manter a temperatura baixa. A temperatura da água de enxágüe deve estar o mais próxima possível de 0°C para que se alcancem os melhores benefícios. Baixas temperaturas durante o transporte, armazenamento e nos pontos de venda diminuem o amadurecimento e outros processos metabólicos, reduzem a deterioração e podem minimizar os efeitos do etileno (Brecht, 1995). A manutenção da temperatura a 1 ou 2°C acima do ponto de congelamento ou acima do ponto em que a injúria pelo frio ocorre, pode aumentar a vida útil em pelo menos 3 a 5 vezes ou mais, quando comparado ao armazenamento a 10°C (Wills et al., 1989).

Baixas temperaturas retardam a respiração e a transpiração de frutas e hortaliças frescas. Portanto, o pré-resfriamento dos tecidos da planta que está respirando rapidamente ou alcançando a senescência, como os vegetais folhosos, é necessário para diminuir as mudanças metabólicas. Convém salientar que a redução no teor de nutrientes é inevitável mesmo durante o armazenamento

refrigerado (Klein, 1987). Mais da metade do ácido ascórbico presente em folhas de alface foi perdido durante 6 dias de armazenamento refrigerado (Zepplin e Elvehjen, 1944). Friedman (1951) observou que o resfriamento sob vácuo era benéfico para a manutenção da qualidade de saladas de alface.

Muitos fatores afetam a estabilidade do alface cortado durante o seu armazenamento, sendo a temperatura o mais importante. Porções armazenadas a 2°C mantiveram a sua aceitabilidade comercial por um período 2,5 vezes maior do que o mesmo produto mantido à temperatura de 10°C (Bolin et al., 1977).

O alface cortado e armazenado a 5°C tem uma vida útil significativamente menor, determinada pela avaliação da aparência e odor, do que o armazenado a 1°C (McDonald, Risse e Barmore 1990).

Bolin et al. (1977) reportam que mantendo o alface cortado em temperatura baixa, usando facas afiadas, minimizando o dano celular, removendo o líquido da superfície e reduzindo a população de bactérias, pode-se conseguir um aumento da sua vida útil. A lavagem e a secagem do alface picado também são etapas importantes para o aumento de sua vida útil.

2.2.3 Atmosfera modificada

Frutas e hortaliças minimamente processadas são constituídas por tecidos vivos, sujeitos à respiração e ao metabolismo catabólico. Procedimentos visando a redução da taxa de respiração diminuem a qualidade sensorial devido a mudanças oxidativas de pigmentos e lipídeos; contudo, podem também diminuir as mudanças bioquímicas oxidativas que levam à senescência dos tecidos. A embalagem de produtos minimamente processados em filmes poliméricos impermeáveis, contentores semi-rígidos ou ambos, pode reduzir a concentração de O₂ e aumentar a concentração de CO₂ na atmosfera da

embalagem, diminuindo as mudanças na qualidade e aumentando a vida útil do produto (Schlimme, 1995).

A embalagem em atmosfera modificada é amplamente utilizada para frutas e hortaliças minimamente processadas, embora não seja suficiente para impedir o começo da fermentação sob as condições normais de comercialização (Cameron, Talasila e Joles, 1995). Filmes plásticos semi-permeáveis são escolhidos de tal maneira que a sua permeabilidade e a taxa de respiração do produto possam ser combinados para obtenção de uma atmosfera de equilíbrio dentro da embalagem. Devido à taxa de respiração, a composição gasosa no interior da embalagem varia com o tempo até alcançar uma atmosfera de equilíbrio, que é função basicamente do tipo e quantidade de produto, das características do filme utilizado, da atmosfera inicial e da temperatura de armazenamento.

A atmosfera modificada que melhor mantém a qualidade e a vida de armazenamento de produtos minimamente processados apresenta uma faixa de oxigênio de 2 a 8% e concentrações de dióxido de carbono de 5 a 15%. Concentrações de monóxido de carbono de 5 a 10% sob condições de baixa concentração de oxigênio (< 5%) retardam o escurecimento e reduzem o crescimento microbiano, aumentando a vida útil de alface e outros produtos (Brecht, 1980; Kader, 1980; Mazollier, Bardet e Bonnafoux, 1990; Cantwell, 1992).

Os materiais co-extrudados que apresentam maior aplicabilidade para a embalagem de frutas e hortaliças têm sido fabricados através de misturas de polietileno (PE), combinando polietileno linear de baixa e média densidade com polietileno acetato de vinila (EVA). As resinas de PE são boas barreiras para a umidade e o EVA apresenta uma difusividade para o O₂ maior que as resinas de PE. A espessura típica destes materiais é de aproximadamente 2 milipolegadas transversais para sacos e 0,6 milipolegadas lineares para filmes aplicados. Estes

materiais co-extrudados têm uma taxa de difusão de oxigênio de 3000 a 7000 cm^3 e uma taxa de difusão de vapor d'água de 0,5 a 1,2 gramas (Barmore, 1987).

Visando a comercialização institucional, a embalagem de grandes volumes de hortaliças pré-cortadas, particularmente para alface, utiliza um sistema de atmosfera modificada para minimizar o escurecimento. Neste caso, o material da embalagem é constituído de sacos de polietileno ou de materiais co-extrudados que apresentem uma taxa de difusão ao O_2 de 3000 a 4000 cm^3 . O produto é embalado sob ligeiro vácuo para reduzir o volume vazio e para abaixar o volume de O_2 (Barmore, 1987).

As taxas de difusão do O_2 são comumente usadas para descrever os filmes e são cerca de um terço a um quinto das taxas de difusão do CO_2 (McDonald, Risse e Barmore 1990).

Na embalagem de produtos minimamente processados, filmes com multicamadas, freqüentemente com acetato de vinil etileno, podem ser fabricados com diferentes taxas de difusão de gases. Para alface cortado, têm sido usados, sacos de polietileno co-extrudado com 8% de acetato de vinil etileno com espessura de 0,06 mm (Cantwell, 1992).

Frutas e hortaliças minimamente processadas apresentam níveis de atividade metabólica maiores que as de produtos intactos, incluindo altas taxas de respiração e de produção de etileno. As propriedades de difusão dos gases também são completamente diferentes, apresentando um menor gradiente de concentração de gases dentro do tecido. (Kader, Zagory e Kerbel, 1989).

As difusividades do CO_2 e do O_2 no filme utilizado para a embalagem são essenciais para manter a atmosfera dentro do produto e não causar o desenvolvimento de odores desagradáveis ou danos fisiológicos nas condições ideais de armazenamento (Barmore, 1987).

Os resultados encontrados por McDonald, Risse e Barmore (1990) indicam que a taxa de difusão de gases no filme e a temperatura de

armazenamento são importantes no aumento da vida útil do alface cortado, em concordância com outros autores (Bolin et al., 1977; Krahn, 1977). McDonald, Risse e Barmore (1990) observaram também que a descoloração e o aparecimento de odores estranhos podem ser detectados sensorialmente quando os níveis de CO₂ estão acima de 20%. Abaixo deste valor, nenhuma destas anormalidades foi detectada. Todos os sacos mal selados apresentavam escurecimento devido à elevação dos níveis de O₂.

O dióxido de carbono, em níveis elevados, pode ser prejudicial para alguns tecidos de plantas. Em alface, alto nível de CO₂ (> 2%) pode causar lesões (manchas marrons). Neste caso, o alface cortado é mais tolerante que o produto intacto (Ballantyne, Stark e Selman, 1988b e Mateos et al., 1993b). No entanto, segundo Siriphanich e Kader (1985), elevados níveis de CO₂ retardam o escurecimento em alface. A qualidade do alface cortado foi mantida pelo controle da atmosfera da embalagem utilizando uma concentração de 10% de CO₂ e de 3% de O₂ (Barriga et al., 1991).

Segundo Barriga et al. (1991), a qualidade visual do alface, diminuiu no decorrer do armazenamento e as mudanças foram semelhantes em atmosfera ambiente, com 3% de O₂ e com 3% de O₂ + 5% de CO₂. A qualidade visual foi significativamente preservada sob atmosfera formada por 3% de O₂ e 10% de CO₂, prevenindo o escurecimento. O CO₂ é conhecido na prevenção do escurecimento dos tecidos danificados pelo bloqueio na produção de compostos fenólicos, bem como na inibição da atividade da polifenoloxidase (Siriphanich e Kader, 1985). Possivelmente, altos níveis de CO₂ podem exercer um grande efeito na vida útil do produto.

O alface cortado fermenta quando o nível de O₂ dentro da embalagem for menor ou igual a 1% (Ballantyne, Stark e Selman, 1988b e McDonald, Risse e Barmore 1990). Baixos níveis de O₂, porém sem anaerobiose, aparentemente reduzem o escurecimento e a senescência de alface pré-cortado e floretes de

brócolis (Ballantyne, Stark e Selman, 1988a, 1988b e McDonald, Risse e Barmore 1990).

King Jr. et al. (1991) reportaram que a avaliação pela escala visual demonstrou a influência da embalagem na qualidade visual do alface picado. A nota inicial 9 indicava excelente qualidade visual. Após a estocagem, a nota da avaliação visual caiu para 7 (bom) na embalagem selada, enquanto para a embalagem não selada, a nota foi 3 (pobre).

Krahn (1977) reporta que a melhor qualidade do alface cortado foi obtida embalando o produto em um filme de polipropileno, na qual a modificação da atmosfera própria gerada encontrava-se com 9% de CO₂ e 11% de O₂, a 0°C, em 2 semanas. Ballantyne, Stark e Selman (1988b) reportam que o menor escurecimento e a ausência de odores estranhos para alface cortado foram obtidos pelo uso de um filme de polietileno de baixa densidade e uma atmosfera modificada equilibrada em 5 a 6% de CO₂ e 1 a 3% de O₂ a 5°C.

Varoquax, Mazollier e Albagnac (1996) notaram que as concentrações de CO₂ nas embalagens de alfaces cultivadas no inverno foram muito maiores do que as daquelas encontradas em alfaces cultivados no outono, refletindo, talvez, uma maior taxa de respiração intrínseca do alface cultivado no inverno.

Segundo os mesmos autores (Varoquax, Mazollier e Albagnac 1996), é possível aumentar o tempo de vida útil do alface cv. Manteiga minimamente processado pela manutenção de níveis baixos de O₂ e CO₂, através da injeção de N₂, visando reduzir a concentração inicial de O₂ para menos de 3%. Cultivares com alta taxa de respiração e baixo teor de açúcares não devem ser minimamente processados, a exemplo da cultivar Ritmo. Com a concentração de O₂ abaixo de 3%, e no caso de armazenamento em temperaturas altas (maiores que 10°C), a taxa de respiração aumenta e o metabolismo do alface muda para o modo anaeróbio, resultando em acúmulo de CO₂ dentro das embalagens e uma rápida deterioração. O CO₂ em concentrações maiores que 10% ajuda a prevenir

o escurecimento das superfícies cortadas e da nervura central das folhas das cultivares não sensíveis à desordem denominada “mancha marrom”.

Ainda segundo Varoquax, Mazollier e Albagnac (1996), o estabelecimento de atmosferas apropriadas, mesmo em caso de temperaturas altas, poderá requerer filme com baixa permeabilidade ao O_2 (cerca de $900 \text{ ml CO}_2/\text{m}^2 \text{ dia atm}$) e muito alta permeabilidade ao CO_2 (cerca de $50000 \text{ ml CO}_2/\text{m}^2 \text{ dia atm}$). Uma nova geração de filmes elastoméricos compostos de blocos de poliéter amidas pode resolver parte do problema. Estes filmes são hidrofílicos e sua permeabilidade ao CO_2 aumenta fortemente com o aumento da hidratação, mas a difusão do O_2 permanece quase constante.

O escurecimento da alface cortada ocorre antes do estabelecimento de uma atmosfera benéfica decorrente da respiração do produto (Cantwell, 1992).

Em alface, um alto teor de oxigênio resulta no escurecimento da superfície dos cortes devido à ação de enzimas como as polifeniloxidasas que catalisam a oxidação dos compostos fenólicos presentes na célula. Segundo estudos da literatura, para o alface é necessário um teor de O_2 de aproximadamente 3% dentro da embalagem para evitar o escurecimento enzimático e a anaerobiose. A literatura indica também que, para o alface, a proporção ótima de CO_2 oscila entre 5 a 10%. Concentração de CO_2 superior a 10% estimula a produção de álcoois, com conseqüente desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis (Mazollier, Bardet e Bonnafoux 1990). Quando a concentração de CO_2 supera 15%, os tecidos são danificados, evidenciados pelo aparecimento de manchas pardas e lignificação (Lipton, 1987; Saltveit e Ke, 1989; Segall e Scanton, 1996; McDonald, Risse e Barmore 1990; Mateos et al., 1993b).

Sabe-se que o aumento na temperatura durante o transporte, manuseio e venda de produtos embalados sob atmosfera modificada poderá causar uma diminuição dos níveis de O_2 nas embalagens devido à tendência da respiração

aumentar mais do que a permeabilidade através do filme polimérico (Kader Zagory e Kerbel, 1989). A atmosfera desfavorável gerada pelas altas temperaturas pode causar disfunções bioquímicas e fisiológicas, muitas vezes caracterizadas por odores estranhos e alterações no amadurecimento (Barmore, 1987).

Embora as embalagens sob atmosfera modificada de frutas e hortaliças minimamente processadas possam aumentar a vida útil destes produtos, elas não conseguem superar os efeitos negativos causados pelo aumento da temperatura (Kader, Zagory e Kerbel 1989). A variação na taxa de respiração dos produtos e na difusividade dos gases, as limitações impostas pelos filmes poliméricos disponíveis e a possibilidade de exposição a temperaturas elevadas durante o manuseio e distribuição não permitem que haja uma garantia sobre a uniformidade da atmosfera contida nas embalagens. Se não houver um controle adequado do nível de O_2 , este pode atingir um valor abaixo dos níveis de segurança nestas embalagens (Cameron et al. 1993). Os riscos incluem não somente a perda da qualidade do produto através do metabolismo fermentativo, mas também pelo potencial de crescimento de patógenos humanos que se desenvolvem em condições anaeróbicas (Hintlian e Hotchkiss, 1986).

Em embalagens fechadas de alface cortado, a concentração de CO_2 aumentou acima de 20% e a de O_2 diminuiu para 1-2% em dez dias, a $4,4^\circ C$ (Priepke, Wel e Nelson 1976).

Para o aumento da vida útil do alface cortado cv. Salinas, quando mantido entre 1 e $5^\circ C$, o tipo de filme plástico a ser usado deve ter uma permeabilidade difusiva ao oxigênio superior a $3000 \text{ ml.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}.\text{atm}^{-1}$, a $22^\circ C$ (McDonald, Risse e Barmore, 1990).

Bolin e Huxsoll (1991) reportam que a condição ótima de armazenamento a frio foi obtida pela embalagem do alface cortado em sacos mantidos sob ligeiro vácuo e baixa quantidade de CO .

Na comercialização de frutas e hortaliças em embalagens sob atmosfera modificada, pode ocorrer um sério problema associado à alta umidade dentro da embalagem, representado pela condensação sobre o filme plástico quando o produto é submetido a oscilações de temperatura. A quantidade de condensado formado é função da diferença de temperatura dentro e fora da embalagem, do volume vazio da embalagem e também da natureza do polímero (Cameron, Talasila e Joles 1995).

A atmosfera modificada por embalagens seladas diminuiu o crescimento da microbiota bacteriana, aeróbia e facultativa. Por outro lado, a contagem de leveduras não foi inibida pela presença de atmosfera modificada. As embalagens comerciais seladas apresentam contagem microbiana significativamente menor quando comparadas às embalagens não seladas (King Jr. et al., 1991).

López-Gálvez, Saltveit e Cantwell (1996a) concluem que a magnitude dos benefícios derivados do uso da atmosfera controlada necessita de maiores contribuições em relação aos tipos e cultivares de alface, das combinações atmosfera-temperatura e do tempo de vida útil necessário comercialmente.

3 Aspectos fisiológicos e bioquímicos

3.1 Indução da respiração e do etileno pelo fermento

⇒ Mudanças fisiológicas indesejáveis são um dos maiores problemas no processamento mínimo. Perda da integridade celular na superfície do corte da fruta ou hortaliça destrói a compartimentação de enzimas e substratos, provocando reações de escurecimento e formação de metabólitos secundários indesejáveis. A senescência do tecido pode ser acelerada com o aumento da produção de etileno e da respiração próximo à superfície cortada, podendo ocorrer o desenvolvimento de odores estranhos. Além disso, o exsudado da

⇒ superfície cortada é um meio favorável para o crescimento de fungos e bactérias. Como o produto é manuseado, a facilidade para a sua contaminação e para o crescimento da microbiota aumenta, podendo ocorrer riscos para a saúde do consumidor (Burns, 1995). A redução das conseqüências negativas em frutas e hortaliças minimamente processadas poderá resultar no aumento da vida útil e na manutenção das características nutricionais, da aparência e do aroma (Brecht, 1995).

A fisiologia de frutas e hortaliças minimamente processadas é essencialmente típica dos tecidos de plantas que foram feridos ou submetidos a condições de *stress*.

⇒ O ferimento dos tecidos das plantas pode causar a degradação das membranas lipídicas (Rolle e Chism, 1987). Extensiva degradação enzimática ocorre nos sistemas de membranas danificados, causando perda de componentes lipídicos e de compartimentação de enzimas e substratos. O etileno produzido por causa do ferimento pode aumentar a permeabilidade das membranas e reduzir a biossíntese de fosfolipídeos (Watada, Abe e Yamauchi, 1990).

A desorganização das membranas celulares e das organelas, como conseqüência da quebra da cadeia de lipídeos, resulta em uma rápida deacilação dos glicolipídeos nos tilacóides do cloroplasto (Mazliak, 1983; Rolle e Chism, 1987). A deacilação dos glicolipídeos das membranas, fosfolipídeos e galactolipídeos resulta na liberação e acúmulo de ácidos graxos livres, os quais são tóxicos para a maioria dos processos celulares, causando a quebra dos sistemas biológicos e inativando proteínas (Galliard, 1979). Os ácidos graxos polinsaturados livres também podem ser degradados por enzimas oxidativas como as lipoxidases e lipoxigenases (Mazliak, 1983).

⇒ O aumento na respiração em tecidos feridos de plantas é uma conseqüência da elevação na produção de etileno. A hidrólise do amido é

umentada e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, bem como a cadeia de transporte de elétrons, são ativados (Laties,1978).

Com o aumento na área da exposição dos tecidos injuriados, o ritmo respiratório aumenta várias vezes. Segundo Brecht (1995), em comparação com o produto inteiro, a atividade respiratória aumenta 1,2 vezes em chicória cortada, 2,0 vezes em alface cortada e até 7,0 vezes em cenoura ralada.

A taxa de respiração dos tecidos de plantas se reduz com baixos teores de O₂ e altos de CO₂. Baixos teores de O₂ reduzem a produção de etileno nos tecidos e altos teores de CO₂ inibem a síntese e a ação do etileno. Concentrações baixas de O₂ conduzem à anaerobiose, caracterizada pela produção de álcoois, odores e sabores desagradáveis. Altas concentrações de CO₂ causam toxicidade através da dissolução dos líquidos celulares, com uma diminuição do pH que pode acarretar outras desordens fisiológicas. Segundo Jones (1989) e Kader, Magory e Kerbel (1989), a pH 6,0 ou abaixo, o ácido carbônico se dissocia em bicarbonato e íons hidrogênio, causando uma ligeira queda do pH. A destruição da clorofila, que leva ao amarelecimento indesejável em hortaliças folhosas, pode ser uma consequência destas mudanças de pH.

Cantwell (1995) afirma que a taxa de respiração para alface cortada, comparada com o produto inteiro, aumenta em 100%. Segundo adaptação de Chitarra e Chitarra (1990), o quadro abaixo apresenta o efeito da temperatura sobre a taxa respiratória da alface inteira e das folhas, expressa em mgCO₂/Kg.h.

Produto	Temperatura (°C)					
	0	4-5	10	15-16	20-21	26-27
Alface(cabeça)	6-17	13-20	21-40	32-45	51-60	73-91
Alface(folha)	19-27	24-35	32-46	51-74	82-119	120-173

Brecht (1980) mostrou que taxa de respiração de alfaces inteiras foi reduzida durante a estocagem quando 1% de monóxido de carbono foi incorporado no espaço vazio da embalagem. O mecanismo de reação no qual o CO retarda o escurecimento em alface ocorre provavelmente pela inativação da enzima polifenoloxidase. Bolin e Huxsoll (1991), através de testes utilizando absorvedores de etileno, demonstraram que a produção de etileno não foi o fator responsável pelo escurecimento do produto.

2.3.2 Escurecimento enzimático

⇒ O escurecimento oxidativo na superfície cortada é o fator limitante no armazenamento de muitas frutas e hortaliças minimamente processadas (Brecht 1995). A descoloração na superfície do corte de frutas e hortaliças pode ocorrer devido a quebra da compartimentação que ocorre quando as células são rompidas, liberando e colocando em contato substratos e oxidases. O fermento também induz a síntese de algumas enzimas envolvidas nas reações de escurecimento ou biossíntese de substratos (Rolle e Chism, 1987). A intensidade do escurecimento em diversos tecidos pode ser afetada pela atividade relativa das oxidases e pela concentração dos substratos (Hansche e Boynton, 1986).

⇒ Segundo Whitaker e Lee (1995), polifenoloxidase é um termo genérico para um grupo de enzimas que catalizam a oxidação de compostos fenólicos, produzindo uma coloração marrom na superfície cortada de frutas e hortaliças. Na presença de oxigênio, um rápido escurecimento ocorre devido à oxidação enzimática dos fenóis para ortoquinonas, as quais rapidamente se polimerizam, formando compostos escuros, como as melaninas. Os fatores mais importantes que determinam a taxa de escurecimento enzimático de hortaliças e frutas são: a concentração ativa de polifenoloxidase e compostos fenólicos presentes, o pH, a temperatura e a disponibilidade de oxigênio do tecido. O pH ótimo para a

atividade da polifenoloxidase varia com a origem da enzima e com o substrato. Na maioria dos casos, a faixa ótima de pH está entre pH 4 e 7. A temperatura de estabilidade da polifenoloxidase varia com as espécies e com as cultivares (Laurila, Kervinem e Ahvenainen, 1998).

Os compostos fenólicos originam-se da hidroxilação do ácido cinâmico, o qual é formado pela desaminação da fenilalanina, catalizada pela fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima chave que regula o metabolismo fenilpropanóide (Ke e Saltveit, 1989a), levando à formação de compostos secundários, como o ácido clorogênico e o ácido caféico (Peiser et al. 1998). A atividade da FAL aumenta em resposta a vários tipos de *stress*, incluindo ferimentos (Ke e Saltveit, 1989d), exposição ao etileno (Hyodo, Kuroda e Yang, 1978) e infecções por fungos (Jones, 1984).

Tanto o etileno quanto o ferimento induzem a atividade da FAL em muitos tecidos de plantas (Abeles, Morgan e Saltveit, 1992), mas aparentemente por mecanismos distintos. Pesquisas usando inibidores da síntese de etileno, como o AVG (aminoetoxivinilglicina) mostraram que o etileno sozinho não controla a indução desta enzima em alfaces (Ke e Saltveit, 1989c). O escurecimento ocorre quando os produtos do metabolismo dos fenilpropanóides, tais como vários fenólicos e possivelmente outros substratos como as antocianinas, são oxidados em reações catalisadas por fenolases, como a polifenoloxidase ou peroxidases (Hanson e Havir, 1979).

O maior defeito em alface minimamente processada é o escurecimento dos tecidos cortados. Técnicas que retardam o escurecimento da superfície e das bordas das folhas incluem o armazenamento em baixas temperaturas (Bolin e Luxsoll, 1991), atmosferas modificada ou controlada através de O₂ e/ou CO₂ (Ke e Saltveit, 1989c; Mateos et al., 1993a,b e Heimdal et al., 1995) e a utilização de antioxidantes (McEvily, Iyengar e Otwell, 1992).

O fermento induz o aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) (Hyodo, Kuroda e Yang, 1978; Hanson e Havir, 1979; Ke e Saltveit, 1989d), da polifenoloxidase (Kahn, 1977; Bower e Van Lelyveld, 1985) e de um número de outras enzimas que contribuem direta ou indiretamente para o escurecimento. A atividade da FAL aumentou no tecido das nervuras do alface com fermentos e armazenadas na presença e na ausência de etileno. A atividade desta enzima aumentou 2,5 e 3 vezes a 5 e 15°C, respectivamente, quando o tamanho das nervuras foi reduzido de 2,5 x 15 para 0,5 x 1 cm. Fatores pré e pós-colheita afetaram a atividade da FAL induzida por fermentos e as subsequentes variações na qualidade de alface minimamente processado. A taxa de aumento desta enzima e o índice máximo alcançado foram influenciados pela duração do armazenamento antes do processamento. (López-Gálvez, Saltveit e Cantwell, 1996b).

O fermento aumenta a atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) e a função do grau de injúria. O fermento induz altos níveis da atividade da FAL não somente nas células próximas ao fermento, mas também nas células localizadas a 2,5 cm de distância, sendo que o sinal para indução da FAL é transmitido a uma velocidade média de cerca de 0,5 cm.h⁻¹ do local da injúria. As injúrias aumentam a concentração de diversos compostos fenólicos solúveis (catequinas, ácido clorogênico e ácido caféico) dos tecidos adjacentes, que são facilmente oxidados, em minutos, a substâncias marrons pela polifenoloxidase existente nos tecidos do alface (Ke e Saltveit, 1989c).

Alguns pesquisadores (Couture, Cantwell e Saltveit, 1993 e López-Gálvez, Saltveit e Cantwell, 1996b) têm reportado que o aumento da atividade da FAL correlaciona-se com a diminuição da vida útil e da qualidade visual do alface minimamente processado. Um aumento na atividade desta enzima foi observado antes do aparecimento do escurecimento em alfaces minimamente processados, e segundo esses autores este fato pode ser usado para prever a

vida útil do produto devido à correlação existente entre a indução da FAL pelo etileno ou pelo fermento e a avaliação da qualidade do produto.

Couture et al. (1993) concluem, em seu trabalho, que nenhum atributo no primeiro dia do experimento pode ser usado para prever a vida útil e a qualidade final do alface minimamente processado. A avaliação dos sintomas de “russet spotting”, teor de fenólicos e a qualidade visual medida no início do experimento não estão significativamente correlacionados com a qualidade final do produto. No entanto, a atividade da FAL induzida pelo etileno no terceiro e quarto dias está significativamente correlacionada com a qualidade final do armazenamento do alface minimamente processado, tratado com etileno, uma vez que neste período a atividade elevou-se de 250% para 530%. Desta forma, a atividade da FAL induzida pelo etileno possivelmente pode ser usada como um indicador para a predição da vida de armazenamento e da qualidade final do alface minimamente processado.

“Russet spotting” (RS) é a maior desordem fisiológica induzida pelo etileno, em cultivares Iceberg, também chamado de alface crespo, caracterizada pelo aparecimento de numerosas e pequenas (1 a 2 mm de diâmetro), pintas marrons ao longo dos dois lados da nervura central, podendo se espalhar, em casos severos, por toda a folha. Aplicações de cálcio ou auxinas inibem o desenvolvimento de RS e também a atividade da FAL (Ke e Saltveit, 1986). Estes mesmos autores descobriram que a lignificação e o espessamento da parede celular nas lesões dos tecidos afetados pelo RS foram acompanhadas pelo acúmulo e oxidação de flavonóides e derivados do ácido clorogênico pela polifenoloxidase. Estas reações podem produzir o escurecimento característico dos tecidos afetados pelo RS (Ke e Saltveit, 1988).

Hyodo, Kuroda e Yang (1978), no entanto, não encontraram nenhuma correlação entre a atividade da polifenoloxidase e a desordem fisiológica.

A estreita correlação entre a atividade da FAL, teor de fenólicos totais e o desenvolvimento de RS suporta a hipótese de que uma alta atividade da FAL é necessária para a contínua produção de compostos fenólicos usados como substratos para o desenvolvimento do russet spotting (Ke e Saltveit, 1988).

Condições pós-colheita que inibem o RS incluem o armazenamento dos pés de alface a 0°C em atmosferas com baixas concentrações de O₂ e altas concentrações de CO₂ e a diminuição de injúrias físicas (Ke e Saltveit, 1989a).

Segundo Ritenour, Ahrens e Saltveit, (1995), tecidos de alface expostos ao etileno e mantidos a 15-20°C mostram picos na atividade da FAL mais cedo, porém, menores do que os de tecidos mantidos a 5°C. Isto sugere que pode ser possível reduzir a atividade da FAL e o subsequente desenvolvimento do RS pela exposição dos tecidos a temperaturas elevadas, antes que os sintomas visuais apareçam.

2.3.3 Ação da temperatura e da atmosfera modificada

Bown (1985) reporta que elevadas concentrações de CO₂ podem diminuir o pH intracelular em tecidos de plantas. Isto pode acarretar mudanças na atividade de muitas enzimas e na distribuição de auxinas, giberelinas e de alguns ácidos orgânicos. Na atmosfera com 20% de CO₂, o teor de fenólicos totais foi reduzido, provavelmente devido a uma diminuição da atividade da FAL. Quando os tecidos foram expostos ao ar a 20°C, o teor de fenólicos rapidamente aumentou em resposta ao retorno, ao valor normal do pH citoplasmático e do restabelecimento da atividade da FAL, a qual, conforme Shaw, Bolwell e Smith, (1990), está localizada no citoplasma e tem sua máxima atividade em pH 8,5 (Siriphanich e Kader, 1985). A redução da atividade da FAL pode ocorrer se o pH citoplasmático se distanciar do seu valor ótimo.

Heimdal et al. (1995) observaram que o escurecimento enzimático do alface cortado foi inibido, ao menos por 10 dias, através da embalagem sob vácuo moderado em sacos de polietileno com espessura de 80 μm . O tempo de armazenamento superior a 10 dias deve ser evitado devido ao aumento de odores estranhos dentro das embalagens, apesar da boa qualidade visual.

Mateos et al. (1993a) afirmam que o escurecimento pode ser evitado ou reduzido pelo uso de atmosferas ricas em CO_2 .

Respostas do alface a elevadas atmosferas de CO_2 incluem uma diminuição na acidez titulável, indução da fenilalanina amônia liase, acúmulo e oxidação de compostos fenólicos solúveis e lignificação da parede celular (Singh, Wang e Salunkhe, 1972; Siriphanich e Kader, 1985, 1986; Ke e Saltveit, 1989d).

Segundo Mateos et al. (1993b), a exposição do alface às concentrações de CO_2 acima de 2% pode causar uma desordem fisiológica denominada mancha marrom. Os sintomas aparecem inicialmente, na superfície da nervura central da folha, como uma área amarelada, tornando-se mais delineada. É caracterizada pela ocorrência de áreas necróticas superficiais ovaladas e irregulares com margens que são freqüentemente mais escuras do que o centro afundado das folhas.

Segundo López-Gálvez, Saltveit e Cantwell (1996a), o escurecimento é a principal causa da perda de qualidade em alface minimamente processado. A incidência da desordem denominada mancha marrom varia entre os tipos de alface, mas uma atmosfera com 3% de O_2 e 10% de CO_2 controla efetivamente esta desordem. O benefício obtido pelo uso desta atmosfera na manutenção da qualidade das saladas difere e depende do tipo de alface utilizado e da composição da salada.

O alface minimamente processado, ao contrário dos pés inteiros, são menos sensíveis à injúria pelo CO_2 (McDonald, Risse e Barmore 1990). Isto

também foi comprovado por Mateos et al.(1993a), que observaram que tanto para os pés inteiros como para os segmentos de tecidos cortados da nervura central da folha do alface, o armazenamento sob atmosfera a 5% e a 10% de CO₂ não influenciou significativamente as concentrações de etanol e de acetaldeído. Já o tratamento com 20% de CO₂ aumentou acentuadamente a concentração de etanol e moderadamente a concentração de acetaldeído em ambos os produtos. Entretanto, a concentração de etanol e de acetaldeído nos segmentos cortados da nervura central foi somente a metade daquelas dos pés inteiros de alface.

Para o alface cortado, a mancha marrom tem geralmente um menor efeito na qualidade visual, quando comparada ao escurecimento da superfície cortada (Mateos et al., 1993b).

2.4 Aspectos microbiológicos

2.4.1 Fatores de influência

No trabalho com frutas e hortaliças minimamente processadas, considerações sobre microbiologia são sempre essenciais. Estes produtos são obtidos a partir de materiais frescos que podem estar contaminados por agroquímicos e microrganismos deteriorantes, incluindo bactérias, leveduras e bolores. Nos vegetais, a microbiota dominante é formada por microrganismos provenientes do solo (Cantwell, 1992). As principais fontes de contaminação por microrganismos estão no solo, na água de irrigação e na falta de condições adequadas de higiene nos utensílios e nos manipuladores, que poderão veicular microrganismos deteriorantes e patogênicos. Algumas circunstâncias existentes na produção de frutas e hortaliças minimamente processadas aumentam os riscos bacteriológicos. A partir das operações de aparramento e corte, nutrientes do interior dos tecidos são liberados favorecendo o crescimento rápido de

microrganismos no produto, nos equipamentos e utensílios (Brackett et al., 1993). O manuseio humano adicional durante as operações de lavagem, secagem e embalagem aumenta o risco de contaminação por patógenos. Os manipuladores são vetores na transmissão de doenças se eles forem portadores de patógenos e não apresentarem boas práticas de higiene pessoal. Bactérias como *Salmonella spp.* (Pether e Gilbert, 1971), *Shigella spp.* (Davis et al., 1988) e *Listeria spp.* (Kerr et al., 1993) sobrevivem nas mãos dos trabalhadores, o que demonstra a importância da higiene das mãos para evitar a transmissão destes microrganismos.

Robbs (1997) reporta que as infecções hospitalares tinham, no período de 1940 a 1965, os estafilococos como microrganismos predominantes. Desde então, a microbiota intestinal e as bactérias gram negativas têm assumido lugar destacado por incitar doenças infecciosas nos doentes hospitalizados. Maiores impactos recaem nos pacientes em precário estado geral, particularmente nas crianças e idosos com capacidade orgânica e imunológica rebaixadas, permitindo a invasão de germes oportunistas no hospedeiro debilitado. Entre os fatores que podem contribuir, além do pessoal médico-hospitalar e instrumental, poderão concorrer, com elevado potencial de inóculo, as frutas e verduras manipuladas ou consumidas “in natura”. Destacam-se como principais contaminantes de produtos vegetais, as bactérias oportunistas *Pseudomonas aeruginosa* e as enterobactérias *Enterobacter cloacae* e *E. agglomerans* (= *Erwinia herbicola*).

Davis et al. (1988) reportam que em 1986, um surto de shigelose (*Shigella sonnei*) ocorreu nos Estados Unidos devido a uma contaminação de salmão cortado, distribuído comercialmente, e a origem da infecção pode ter sido os manipuladores da indústria processadora. Nunca havia sido relatado que este tipo de produto poderia ser veículo deste patógeno. A forma mais efetiva de prevenir a contaminação do produto é a promoção e a vigilância na boa higiene

dos trabalhadores em todas as etapas da cadeia de manuseio do alimento, desde o campo, planta processadora, até ao consumidor.

Brackett (1987), citando diversos autores, relata que bactérias psicrotroficas patogênicas, como *Aeromonas hydrophila*, isoladas de vegetais frescos, podem causar doenças e até morte.

O aumento da vida útil de frutas e hortaliças minimamente processadas não é o principal objetivo das indústrias processadoras, que tem como grande desafio a segurança do produto (Hurst, 1995).

Segundo Romig (1995), o estado da matéria prima a ser processada e as características da cultivar selecionada têm um grande impacto na população de microrganismos devido ao seu grau de resistência, substrato disponível e resposta às condições de stress. Bactérias como *Pseudomonas spp.* e *Erwinia spp.*, bem como outros microrganismos oportunistas como *Leuconostoc*, podem se tornar um grande problema para o aumento da vida útil dos produtos. Por isto a seleção da cultivar, as práticas culturais pré-colheita, o manuseio pós-colheita e a classificação da matéria prima são fatores interativos, e sua otimização é fundamental para a produção rotineira de produtos com qualidade.

2.4.2 Microbiota

Nguyen-the e Carlin (1994) reportam que vários microrganismos podem ser encontrados em produtos pré-cortados, incluindo uma microbiota mesofílica, bactérias ácido-láticas, coliformes fecais, leveduras, bolores e uma microbiota pectinolítica. Nos produtos processados, a maior população é de microbiota mesofílica, seguida por bactérias ácido-láticas. Entretanto, o tipo e a população diferem com o produto, práticas culturais e a sanificação (Watada, Ko e Minott, 1996).

Muitas das bactérias isoladas nos vegetais são pectinolíticas e podem causar a quebra dos tecidos. As bactérias pectinolíticas predominantes são *Erwinia carotovora* e as fluorescentes *Pseudomonas spp.* (Brocklehurst et al., 1987; Liao e Wells, 1987). Outras bactérias pectinolíticas como *Bacillus spp.*, *Cytophaga johnsonae*, e *Xanthomonas campestris* também podem ocorrer (Liao e Wells, 1987). Esses organismos podem crescer em ambientes sob baixa temperatura, em que muitos outros não se desenvolvem.

Saladas de vegetais podem conter outras bactérias que não são necessariamente destrutivas para os tecidos das plantas, como *Enterobacter spp.*, bactérias láticas e *Pseudomonas spp.* (Brocklehurst, Zaman-Wong e Lund, 1987).

Garg, Churey e Splittstoesser, (1990) reportam que a microbiota predominante em vegetais durante o processamento para o preparo de saladas cortadas é constituída de bastonetes gram-negativos, sendo *Pseudomonas spp.* as mais numerosas, e apenas um pequeno número de bactérias láticas e fungos foi identificado.

Manvell et al. (1986) observaram que bactérias láticas podem predominar em saladas de vegetais quando estas são guardadas a uma temperatura de 30°C.

Enquanto as bactérias psicotróficas gram-negativas são as predominantes em frutas e hortaliças minimamente processadas (Neelima, Chivey e Splittstoesser, 1990), o principal microrganismo deteriorante em saladas pré-embaladas parece ser uma bactéria pectinolítica, fluorescente da espécie *Pseudomonas marginalis* (Nguyen-the e Prunier, 1989).

Segundo Brocklehurst, Zaman-Wong e Lund, (1987) e Saddik, El-Sherbeeney e Bryam, (1985), salada mista de vegetais apresentaram contagens de 10^7 a 10^9 UFC/grama. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* foram isoladas de matérias primas vegetais e saladas (Saddik, El-Sherbeeney e

Bryam, 1985). Já Brocklehurst, Zaman-Wong e Lund, (1987) isolaram *Yersinia spp.* e *Escherichia coli* em saladas mistas de vegetais.

King Jr. et al. (1991) reportam que a microbiota identificada no alface é constituída principalmente por bactérias e leveduras. A população bacteriana é majoritariamente de bastonetes Gram-negativos (93% do total isolado). O gênero mais frequente é de *Pseudomonas* (56,7%), *Serratia* (8,1%) e *Erwinia* (8,1%). Outros gêneros, que apareceram em menor freqüência, incluem *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Janthinobacterium* e *Alcaligenes*. Quanto às leveduras, os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Torulaspota* e *Trichosporon* foram isolados das amostras de alface. Comparativamente, poucos gêneros de bolores foram isolados, sendo identificados os gêneros *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

O aumento na população microbiana em alface pré-cortada poderá ter um impacto direto na vida útil do produto. Uma maior carga microbiana inicial diminui a vida de armazenamento (Bolin et al., 1977).

Segundo Robbs (1997), tem sido encontrado, com alguma freqüência, *Pseudomonas aeruginosa* hemolítica e produtora de piocianina em alfaces mantidas em embalagens plásticas, mesmo cultivadas em estufas, a temperaturas que variam de 4° a 41°C. Maxcy (1978) reporta que onze diferentes espécies de bactérias foram identificadas em alface com base na coloração de gram, morfologia e atividade proteolítica e catalase. A contagem total em placas, encontrada pelo autor, foi 10⁵ UFC/grama para alface inteira. Folhas internas têm contagens microbianas mais baixas do que as folhas externas.

Robbs et al. (1998) reportam a presença de *Pantoea agglomerans* causando podridões amareladas em alfaces hidropônicos na região serrana do Estado do Rio de Janeiro, afetando cerca de 80% das bancadas de cultivo. Esta bactéria é um patógeno oportunista, causando problemas em culturas estressadas por agentes abióticos e bióticos, possuindo inúmeros relatos na literatura

itopatológica, e também tem sido apontada como causadora de infecções hospitalares.

Magnuson, King e Torok, (1990) reportam que com base na aparência da colônia, *Pseudomonas spp.*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia carotovora*, o grupo da *Enterobacter agglomerans* e *Serratia spp.* foram isoladas e estão comumente presentes em amostras de alface. Análises das bactérias isoladas mostraram que é evidente que o gênero *Pseudomonas* predomina na população da microbiota do alface fresco e armazenado tanto em embalagens seladas como em embalagens não seladas. Nas amostras armazenadas em embalagens não seladas de alface cortado, uma ampla variedade de espécies de leveduras podem ser isoladas. Em pacotes selados, somente poucas espécies facultativas anaeróbias prevalecem, sendo isoladas com mais frequência a *Pichia fermentans* e a *Torulaspora delbrueckii*, tanto para o armazenamento a curto prazo quanto para longo prazo.

Magnuson, King e Torok, (1990) reportam, em seu trabalho, que a contagem de bactérias em alface fresco e processado estava na faixa de 10^5 a 10^7 UFC/ grama, enquanto a população de leveduras estava na faixa de 10^3 a 10^6 UFC/grama. A presença de fungos não foi freqüente e parece que sua presença é evitada a uma possível contaminação, não fazendo parte da microbiota normal do alface. Bactérias isoladas e identificadas dos pés inteiros de alface foram diferentes daquelas encontradas no alface processado. Não foi identificada nenhuma bactéria gram-positiva no alface cortado. O número dos gêneros gram-negativos e espécies identificadas no alface processado foi menor do que no alface inteiro, podendo significar que a lavagem durante o processamento pode ter removido alguns microrganismos provenientes do solo.

Nos experimentos realizados por Magnuson, King e Torok, (1990), muitos isolados de bactérias foram proteolíticos, mas surpreendentemente poucos isolados foram pectinolíticos. Estes resultados estão em desacordo com

aqueles encontrados por Liao e Wells (1987), que isolaram *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas spp.* fluorescentes do alface, todas pectinolíticas.

2.4.3 Ação da temperatura e da atmosfera modificada

⇒ De acordo com Nguyen-the e Carlin (1994), o efeito da temperatura de armazenamento pode ser explicado por sua ação direta sobre a taxa de crescimento dos microrganismos, determinando a taxa de respiração do produto, o que causa mudanças na atmosfera gasosa dentro da embalagem, influenciando o comportamento dos microrganismos, e também pode influenciar a taxa de senescência do produto processado, modificando o meio ambiente para os microrganismos.

King Jr. e Bolin (1989) reportam que existem bactérias que podem sobreviver por longos períodos a 5°C, tais como *Campylobacter jejuni* e *Brucella spp.* Outro grupo de bactérias patogênicas que conseguem sobreviver em temperaturas acima de 5°C, podendo causar risco para a saúde, inclui *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Segundo Corlett (1989), quando o produto minimamente processado é mantido a uma temperatura igual ou maior que 7°C durante o armazenamento ou distribuição, o crescimento de outras bactérias patogênicas como *Clostridium botulinum*, *Bacillus spp.*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* pode ocorrer. Além disto, ao contrário de frutas e hortaliças enlatadas ou congeladas, este tipo de produto é consumido cru, o que aumenta os riscos para o consumidor.

Hurst (1995) reporta que os maiores riscos bacteriológicos em frutas e hortaliças minimamente processadas envolve alguns aspectos como a

refrigeração, todavia não confere uma proteção adequada contra microrganismos patogênicos, já que diversas bactérias patogênicas podem sobreviver e até mesmo se reproduzir sob condições refrigeradas.

Alguns pesquisadores observaram que em produtos embalados sob atmosfera modificada, existe o efeito metabiótico, consistindo no desenvolvimento de um determinado microrganismo, tornando as condições do meio mais favoráveis para o crescimento de outros, que inicialmente não cresceriam neste meio. Por exemplo, bactérias e fungos podem crescer em alimentos com pH ácido, permitindo posteriormente o crescimento de *Clostridium botulinum* (Anderson, 1984; Mundt e Norman, 1982).

Segundo Hintlian e Hotchkiss (1986), sob atmosfera modificada a inibição de microrganismos deteriorantes gram-negativos, tal como as *Pseudomonas spp.*, coincide com o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico gram-positivas, como os *Lactobacillus*.

Berrang, Brackett e Beuchat, (1989) reportam que enquanto o armazenamento sob atmosfera modificada inibe a taxa de crescimento de muitos microrganismos deteriorantes, certos patógenos podem se desenvolver sob condições de baixas concentrações de O₂ em níveis perigosos, durante o armazenamento. Segundo Wiley (1994), os microrganismos diferem em sua sensibilidade aos gases usados em atmosferas modificadas. O CO₂ tem efeitos diretos e indiretos sobre os microrganismos. Segundo Clark e Takacs (1980), o impacto do CO₂ sobre os microrganismos varia dependendo do microrganismo em questão, da concentração do gás e da temperatura.

Tratamentos químicos têm sido de pouco valor no aumento da vida útil do alface cortado (Priepke, Wei e Nelson, 1976; Bolin et al., 1977). Entretanto, efeitos benéficos da atmosfera modificada têm sido reportados por Priepke, Wei e Nelson (1976) e Ballantyne, Stark e Selman (1988b), entre outros. Embora a atmosfera modificada possa mudar o perfil microbiano geral do alimento

(Brackett, 1987), estes efeitos têm sido pouco estudados (Barriga et al., 1991). A mudança verificada com maior frequência é a proliferação de bactérias gram-positivas e, mais especificamente, das bactérias ácido-láticas (Sinell, 1980)

Bennik et al.(1996) relatam a evidência de que a microbiota epifítica tem um potencial de crescimento maior que os microrganismos patogênicos em produtos embalados sob atmosfera modificada. Contudo, segundo Gorris e Bennik (1995), fatores de segurança adicionais devem ser desenvolvidos para o uso em sistemas de embalagem sob atmosfera modificada, tais como o uso da biopreservação que utiliza bactérias ácido-láticas, que ocorrem naturalmente no produto, para evitar o crescimento de microrganismos patogênicos.

Beuchat e Brackett (1990) demonstraram que *L. monocytogenes* pode crescer em saladas de vegetais frescas embaladas sob atmosfera modificada em temperaturas rotineiramente utilizadas durante o transporte, comercialização e armazenamento.

Bennik et al. (1996), estudando chicória minimamente processada, demonstraram que as condições de atmosfera modificada que foram favoráveis para a qualidade do produto retardaram o crescimento de microrganismos deteriorantes durante o armazenamento a baixas temperaturas. Contudo, patógenos psicotróficos inoculados não foram inibidos e os autores afirmaram que a microbiota epifítica tem um maior potencial de crescimento do que os patogênicos nos produtos armazenados sob atmosfera modificada.

Gibbs, Davis e Fletcher, (1994) afirmam que para o alface cortado mantido sob severas condições de hipoxia, uma atenção deve ser dada para se evitar o risco de desenvolvimento de *Clostridium botulinum*.

Priepke, Wel e Nelson (1976) mediram a taxa de respiração em função do tempo de armazenamento do alface embalado sob atmosfera constituída somente por ar e observaram que após dois dias de armazenamento a 4°C, o acúmulo de CO₂ (respiração total) da alface cortada era o dobro do produto

ntacto. Os mesmos autores mediram a contagem total em placas do alface inteiro e cortado e observaram que o alface inteiro apresentou uma fase lag de crescimento correspondente a 2 dias, o mesmo não ocorrendo para o alface cortado; e que a contagem total de microrganismos no cortado aumentou 1000 vezes após 8 dias quando comparada à contagem do alface inteiro após 10 dias. Os autores reportam que a taxa de aumento de microrganismos entre alface intacto e cortado é aproximadamente igual, após a fase lag inicial.

Magnuson, King e Torok, (1990) afirmam que existe uma mudança na microbiota durante o armazenamento a longo prazo, presumidamente devido a uma menor competição entre leveduras e espécies de bactérias sob condições de mudanças na atmosfera e no metabolismo do alface. Em sacos plásticos não selados que apresentam mais oxigênio, maiores variedades de bactérias e de leveduras são encontradas. Existe uma menor diversidade na microbiota bacteriana em sacos plásticos selados pela presença de uma maior quantidade de O_2 , o qual seleciona os microrganismos sobreviventes.

Barriga et al. (1991), utilizando alface cortado cv. Great Lakes, observaram a população inicial de microrganismos e as suas mudanças sob diferentes atmosferas controladas. Os autores não encontraram microrganismos patogênicos aos humanos e concluíram que o controle da atmosfera tem um pequeno ou nenhum efeito sobre a população estudada. Uma atmosfera de 3% de O_2 + 10% de CO_2 manteve uma aceitável qualidade visual do alface, sem afetar apreciavelmente o desenvolvimento microbiano.

Segundo Barriga et al. (1991), em alface, tanto a população de microrganismos mesofílicos aeróbios quanto a de microrganismos psicotróficos aumentou de um nível inicial de 10^4 para 10^7 UFC/g. A população inicial de bactérias ácido-láticas, a qual é influenciada pela estação do ano na colheita, área geográfica e cultivar, entre outros fatores, foi maior quando encontrada uma

alta população inicial. As bactérias ácido-láticas não são necessariamente destrutivas para os tecidos da planta (Brocklehurst, Zaman-Wong e Lund, 1987)

2.4.4 Sanificação

➤ Bactérias patogênicas podem frequentemente contaminar o produto quando baixas condições de sanificação no campo, nas casas de embalagem e no transporte são empregadas (Brackett, 1992, Hurst, 1992). Segundo O'Beime (1990), algumas bactérias que podem estar presentes incluem o *Clostridium botulinum* e a *Listeria monocytogenes*, que são patogênicos aos consumidores, e também outros patógenos, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* que podem contaminar o produto através dos manipuladores.

O uso de solução de cloro com concentração de 50-200 ppm, como agente sanificante, é prática padrão na lavagem de frutas e hortaliças minimamente processadas. Torriani e Massa (1994) afirmam que a lavagem não elimina todos os microrganismos e que eles podem sobreviver quando estão localizados no interior das células ou em áreas não atingidas pelo agente sanificante. Tratamentos inadequados com soluções de cloro podem não eliminar patógenos como *Listeria monocytogenes* (Brackett, 1987) ou reduzir efetivamente a carga de microrganismos deteriorantes (Beuchat e Brackett, 1990) em frutas e hortaliças minimamente processadas. O pH das soluções de cloro deve ser mantido próximo a 7.0 para manter o cloro na sua forma ativa de ácido hipocloroso (Brecht, 1995).

Segundo Bennik et al. (1996), a redução da microbiota inicial pela desinfestação poderá minimizar a deterioração microbiana e aumentar a segurança do produto, entretanto, a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* cresce melhor no produto desinfestado do que sobre o produto não desinfestado

ou lavado com água devido à redução da microbiota residente competitiva, e indica a importância prática da prevenção da recontaminação após a desinfestação.

Adams, Hartley e Cox (1989) relataram que as folhas externas de alface apresentam contagens maiores em 1 ciclo logarítmico quando comparadas com as folhas internas, que estão mais protegidas da contaminação ambiental. Uma lavagem padrão em água remove muitas bactérias das superfícies das folhas, embora um número considerável de microrganismos permaneça nas cavidades, na junção das células epidérmicas e nas dobras da epiderme, resultando na remoção, em média, de 92,4% da microbiota do alface. A inclusão de 100 ppm de cloro livre na água de lavagem (pH 9,0) reduz a contagem em 97,8%. Ajustando o pH da solução de hipoclorito de 9,0 para 4,5 a 5,0 com ácidos orgânicos, causa-se um aumento de 1,5 a 4,0 vezes no efeito microbiológico, devido à presença de cloro livre. A adição de um surfactante, Tween 80, ao hipoclorito reduz o número de microrganismos em 99,6%, mas resulta em diferenças sensoriais. Ainda segundo Adams, Hartley e Cox (1989), na lavagem com hipoclorito, as contagens de microrganismos das suspensões obtidas pela homogeneização das folhas de alface diminuíram por mais de 5 ciclos logarítmicos em 5 minutos. O hipoclorito residual que permanece após a lavagem não mostra nenhuma efetiva atividade antimicrobiana no alface armazenado a altas temperaturas.

Beuchat e Brackett (1990), demonstraram que, em alface, o tratamento com cloro não foi tão efetivo na redução da população inicial de psicotróficos como foi na redução da população aeróbica mesofílica.

⇒ Segundo Cantwell (1992), as Boas Práticas de Fabricação (BPF) são essenciais para o sucesso na comercialização de frutas e hortaliças minimamente processadas. A remoção da terra e contaminantes, através da lavagem com água oxigenada, são necessárias para a redução da carga microbiana antes da embalagem

do produto. Como a umidade livre aumenta o potencial para o crescimento microbiano, torna-se fundamental a remoção desta água de lavagem por centrifugação ou outros métodos. A implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e da Análise de Riscos e Controle dos Pontos Críticos (HACCP) na inspeção das fábricas que produzem frutas e hortaliças minimamente processadas são necessárias para prevenir e controlar riscos bacteriológicos (Scott, 1993).

Sob a ótica do programa HACCP, a preocupação maior é a segurança alimentar e não a qualidade do produto. O uso de HACCP deve ser direcionado para prevenir a presença de bactérias patogênicas ao homem em alface cortado, não garantindo a ausência de folhas marrons (Hurst, 1995).

2.5 Hidroponia

O cultivo de alface por hidroponia possibilita sua produção durante o ano todo, obtendo-se elevada produtividade, com produtos de boa qualidade e sem o risco de contaminação de microrganismos veiculados pelo solo.

Segundo Faquin, Furtini Neto e Vilela, (1996), a aplicação comercial da hidroponia se deu a partir de 1930 pelo professor William F. Gerick da Universidade da Califórnia, que aplicou os conhecimentos da técnica usada em laboratórios ao cultivo prático de hortaliças, flores e tubérculos. A partir destes resultados, o emprego da hidroponia espalhou-se rapidamente pelos Estados Unidos e Europa. Na segunda guerra mundial, o exército norte-americano instalou, com sucesso, unidades de hidroponia em suas bases militares em ilhas do pacífico para a produção de alimentos frescos aos seus soldados, devido às condições adversas ao cultivo tradicional.

Atualmente, o cultivo hidropônico de hortaliças, flores e frutas é encontrado em todos os continentes do mundo. Castellane e Araújo (1994) citam

que a área de produção hortícola em cultivo sem solo na Europa Ocidental, em 1989, superava 6650 hectares.

No Brasil, o cultivo comercial em hidroponia é bastante recente, concentrando-se ao redor dos grandes centros urbanos, sendo utilizado principalmente no cultivo da alface (Faquin, Furtini Neto e Vilela, 1996). Só no Estado de São Paulo, Bernardes (1996) afirma que a produção de alface pelo sistema de cultivo sem solo atingiu cerca de 400 mil unidades/mês em 1996.

Como em hidroponia o cultivo é feito na ausência do solo, a ocorrência de doenças é minimizada, mas não eliminada. As principais doenças que ocorrem em hidroponia atingem, principalmente, as raízes. Quando introduzidos no sistema, os patógenos se disseminam rapidamente através da solução nutritiva que circula por todas as bancadas de cultivo, sendo que a melhor maneira de se evitar problemas é a prevenção. Segundo Tanaka (1995), a água deve ser sempre de boa qualidade e os reservatórios livres de contaminação; os substratos devem ser livres de patógenos e as sementes certificadas e de firmas lóneas; os equipamentos, bancadas e canais devem ser sanificados periodicamente com hipoclorito de sódio e deve-se evitar a entrada de insetos e a presença de pessoas estranhas e de animais que poderão atuar como veículos de contaminação e disseminação de patógenos no sistema.

Como citado anteriormente, os dados da literatura existentes referem-se ao alface cultivado no solo. Os resultados são variados e obtidos a partir de condições muito específicas. A cultivar Iceberg é a mais usada em saladas prontas, mas outras variedades estão sendo utilizadas em saladas mistas. Contudo, o conhecimento sobre o comportamento pós-colheita destas variedades ainda é limitado (López-Gálvez, Saltveit e Cantwell 1996a).

Difícilmente, os dados da literatura podem ser aplicados para as diferentes cultivares e, ainda mais, para sistemas de plantio diferentes, já que há uma forte influência dos fatores pré-colheita e práticas pós-colheita. Para o

alface hidropônico, não há informações disponíveis sobre o seu comportamento fisiológico e microbiológico durante o processamento mínimo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência e seleção da amostra

As plantas inteiras de alface, cultivadas em sistema de hidroponia, foram procedentes da região serrana do Estado do Rio de Janeiro, município de Miguel Pereira, localizado a 113 Km da cidade do Rio de Janeiro, com uma altitude de 518 metros acima do nível do mar. Segundo o escritório local da EMATER/RJ, o município apresenta um clima ameno, com temperaturas médias diárias oscilando na amplitude de 9 a 25°C e com temperaturas máximas de 30°C no verão e mínimas de 2°C no inverno.

A cultivar utilizada foi a Regina, variedade lisa, colhida com maturidade comercial (35 dias), cultivada em estufas de hidroponia, com excelente condição de sanidade e uniformidade. Esta cultivar é resistente a viroses e a condições climáticas adversas. As amostras foram colhidas, ao acaso, pela manhã, no mês de novembro de 1998, e selecionadas por sua uniformidade, pesando, em média, 450 gramas cada uma.

3.2 Metodologia

3.2.1 Processamento

Para remoção do calor de campo e do calor vital, foi realizado no próprio local, um pré-resfriamento das amostras por imersão em água fria, a cerca de 5-8°C. O produto foi imediatamente acondicionado em caixas de isopor com água fria e transportado para o local de processamento, na planta piloto da EMBRAPA-Agroindústria de Alimentos.

Utilizando higiene adequada dos manipuladores (asseio corporal, uso de aventais e luvas) e utensílios (sanificados com 200 ppm de cloro livre), as folhas

externas, as raízes e o colo das plantas foram cortados com facas afiadas de aço inoxidável, e as folhas foram lavadas individualmente em água corrente potável sendo as folhas centrais descartadas. As folhas restantes foram cortadas com facas afiadas de aço inoxidável, com um único movimento e sentido transversal ao longo da nervura central, de maneira a obter tiras com 20 ± 2 mm de largura. Seguindo a metodologia proposta por Hurst (1995), as folhas cortadas foram então lavadas, novamente, por imersão em água fria ($5-8^{\circ}\text{C}$) com 100 ppm de cloro livre, ajustada a pH 7,0, por 15 minutos, e centrifugadas em centrifugadora marca Fanen, modelo 204-NR, a 1500 rpm, por 1 minuto (2,3 g). Pré-testes de centrifugação foram realizados utilizando 2800 rpm por 2 min (segundo Bolin e Huxsoll, 1991), porém causando danos físicos aparentes no produto.

O produto foi acondicionado manualmente em sacos plásticos específicos para folhosas, fabricados pela ITAP Flexíveis S.A., do tipo BOPP/PEBD (Polipropileno bi orientado/Polietileno de baixa densidade), com as dimensões 29,7 cm de comprimento por 26,5 cm de largura interna e com as seguintes especificações: permeabilidade ao vapor d'água de 3 a 4,5 gramas de água/m²/dia; permeabilidade ao oxigênio de 1500 cm³/m²/dia; permeabilidade ao dióxido de carbono de cerca de 4500 cm³/m²/dia; gramatura de 60 gramas/m² e espessura de 64µm. Os sacos contendo 100 gramas de alface cortado foram termosoldados e armazenados em câmaras BOD, marca Fanen, modelo 347 CDG, em temperaturas de 2°C ($2\pm 1^{\circ}\text{C}$) e 10°C ($10\pm 1^{\circ}\text{C}$), que representam as condições ótimas recomendadas e as encontradas à venda no mercado.

O fluxograma a seguir ilustra as fases do preparo da matéria prima:



As análises físico-químicas, químicas, bioquímicas, microbiológicas e sensoriais foram realizadas aos 0, 3, 7, 10 e 14 dias, para as duas temperaturas e armazenamento.

2.2 Avaliações físico-químicas, químicas e bioquímicas

2.2.1) Acidez titulável

Para a determinação da acidez titulável, pesaram-se 10 gramas da mostra em becher de 100mL, transferindo para um triturador com cerca de 10mL de água sem CO₂, em que foram trituradas por 2 minutos e transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 100mL. O balão foi levado a

um aparelho de ultra-som marca Branson, modelo 2210, para a retirada de CO₂ por 15 minutos, e a amostra foi filtrada em seguida. A acidez titulável foi determinada através de um aparelho titulador marca Schott Gerate, modelo Titroline 96, tomando-se uma alíquota de 20mL da solução da amostra titulando-se com uma solução de NaOH 0,01N até pH 8,0. O resultado foi expresso em gramas de ácido cítrico por 100 gramas de amostra.

b) pH

Para a determinação do pH, o procedimento no preparo da amostra foi o mesmo usado para a determinação da acidez titulável, sendo a medida realizada através do mesmo aparelho Titroline 96, com o eletrodo imerso na solução da amostra filtrada, após a devida calibração do aparelho.

c) Dióxido de carbono (CO₂)

O CO₂ presente no interior das embalagens plásticas, foi retirado através de seringas de vidro, com agulhas de aço inoxidável e capacidade de 1 mL específicas para cromatografia gasosa, e determinado durante o armazenamento através de cromatógrafo a gás, modelo Finigam 9001, equipado com detector de condutividade térmica e coluna Poropaq, utilizando-se como gás de arraste o hidrogênio, com um fluxo de 25mL/min.. A temperatura do forno foi de 60°C e a temperatura do vaporizador de 100°C. A amostra de CO₂ foi retirada de dentro da embalagem com o auxílio de seringa de vidro, específica para cromatografia gasosa, perfurando a embalagem diretamente, seguida de fechamento do orifício formado com fita durex. O volume injetado no cromatógrafo foi de 1mL e o resultado, expresso em porcentagem, obtido através de integrador computadorizado (Datajet Integrator Thermoseparation, modelo SP 4600), acoplado ao cromatógrafo.

d) Clorofila total

A clorofila total foi determinada após desintegração das folhas em um homogeneizador de tecidos, conforme recomendação de Bruinsma (1963), utilizando-se 1 grama do material contendo 10mL de água destilada. Ao volume do extrato, após a homogeneização, adicionou-se acetona p.a. até a completa descoloração, seguida de filtração. O volume final do extrato foi de 50mL. A leitura da absorbância foi efetuada a 652nm. Os níveis de clorofila total foram determinados em miligramas por 100 gramas de folhas, segundo a equação adotada por Engel e Poggiani (1991):

$$\text{Clorofila total} = [(A_{652} \times 1000 \times v/1000w)/34,5] \times 100 \quad (1)$$

onde:

v = volume final do extrato clorofila-acetona

w = peso das folhas em gramas.

Os resultados foram expressos em miligramas por 100 gramas de folha fresca.

e) Polifenoloxidase (PFO)

A extração foi feita de acordo com o método proposto por Matsuno e Britane (1972) e a atividade expressa em unidade por minuto por grama de tecido fresco, segundo método proposto por Teisson (1979), pelos seguintes procedimentos:

Para a extração, 100 gramas do tecido vegetal fresco foram homogeneizados por 3 minutos em 100 mL de tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, em um homogeneizador do tipo politron. O produto resultante foi filtrado em papel Whatman nº 1 a vácuo e centrifugado, logo em seguida, a 10.000 rpm por 10 minutos (100 g). O sobrenadante constituiu a fonte enzimática. Todo este procedimento foi realizado a 4°C. Para a determinação da atividade enzimática, adicionou-se 0,5mL do extrato enzimático a 1,8mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) e a 0,050mL de catecol 10mM (recém preparado). Incubou-se o preparo por

30 minutos, a 30°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,8mL de ácido perclórico 2N. Foram utilizados dois tubos branco, substituindo-se o extrato enzimático por água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 395nm.

f) Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A extração foi feita baseada na técnica preconizada por Rhodes e Woollorton (1971), a qual homogeneizam-se 10 gramas da amostra fresca em 60 mL de meio de extração (Tris/EDTA/sacarose/polivinilpirolidona em 1 litro de água bidestilada, com ajuste a pH 8.0 com HCl 2N) por 3 minutos, pH 8.0, a 4°C. Em seguida, procede-se a centrifugação por 10 minutos, a 9500 rpm (90 g). Filtra-se e ajusta-se o pH do extrato sobrenadante a 8.9, com KOH 2N. Para a determinação da atividade enzimática, adicionou-se 1,5mL da solução enzimática, 1,0mL de Tampão Tris e 0,5 mL de solução stock de fenilalanina. Incuba-se em banho maria por 60 minutos, a 40 °C. Para interromper a reação resfria-se em banho de gelo. O branco enzimático foi realizado utilizando-se 1,5mL da solução enzimática, 1,0mL de Tampão Tris e 0,5 mL de água. Incuba-se em banho maria por 60 minutos, a 40 °C e resfria-se em banho de gelo. Em seguida, faz-se a leitura. A atividade enzimática é determinada pela diferença entre as leituras utilizando a fenilalanina e o branco enzimático.

A atividade enzimática foi expressa em unidade por hora por grama de tecido fresco, definida como teor de enzima que produz um aumento na absorção a 290 nm de 0,01, por hora (Zucker, 1965).

3.2.3 Avaliação sensorial

A avaliação da aparência do alface foi realizada através de uma equipe de 7 provadores selecionados por sua aptidão superior em relação à cor. Os provadores participaram, no início do estudo, de 3 sessões abertas a fim de

identificar os atributos do alface que seriam avaliados. Amostras do produto em diferentes estádios de conservação, os quais variaram de fresco até bastante enescente, foram apresentadas às equipes. Os atributos levantados e seus significados são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1: Atributos sensoriais da aparência e suas definições pelos provadores.

Atributos	Definições
Cor	Tonalidades de verde-claro característica do alface, tom homogêneo, uniforme, sem manchas ou áreas descoloradas ou amareladas;
Rescor	aspecto viçoso, vivo e brilhante;
Escurecimento da nervura central	áreas avermelhadas, escuras e/ou marrons, localizadas nas margens laterais da nervura central;
Escurecimento das bordas	áreas avermelhadas, escuras e/ou marrons, localizadas nas margens laterais do tecido cortado e do limbo foliar;
Ressecado	aspecto ressecado, quebradiço, murcho, amolecido, sem rigidez; sem turgor celular
Podre	aspecto deteriorado, enegrecido, melado, com exsudação e odor desagradável acentuados;
Impressão global da aparência	aspecto geral, incluindo todos os atributos juntos, conferindo qualidade ao produto.

Na realização dos testes propriamente ditos, as amostras foram codificadas com números de três dígitos e cada provador recebeu, junto com as suas amostras testadas, duas amostras “dummy” com o objetivo de não viciar os provadores. Os testes foram conduzidos em duas sessões (manhã e tarde). As amostras foram apresentadas monadicamente e avaliadas utilizando escala não estruturada de nove pontos, variando de acordo com o atributo a ser observado. A aparência do alface foi avaliada conforme a ficha abaixo:

Avaliação de alface

Nome:

Data:

Amostra:

Por favor avalie esta amostra de alface quanto à aparência marcando nas escalas abaixo.

Cor

não característica

característica

Frescor

pouco

muito

Escurecimento da nervura central

nenhum

muito

Escurecimento das bordas (queimado)

nenhum

muito

Cozido

ausente

muito

Podre

ausente

muito

Impressão global da aparência

muito ruim

muito boa

Comentários:

Os testes foram realizados em cabines individuais de prova no laboratório de análise sensorial da EMBRAPA-CTAA, sob iluminação branca (luz do dia), a fim de possibilitar a avaliação dos atributos de aparência. As

amostras foram preparadas no mesmo dia da avaliação e mantidas sob refrigeração. Cada amostra foi composta utilizando-se três sacos com 100 gramas de alface cortado. A ordem de apresentação das amostras seguiu um delineamento de blocos completos balanceados, segundo MacFie et al. (1989), em duplicata.

As notas conferidas pelos provadores foram tabuladas e as médias analisadas estatisticamente através da análise de variância e teste de Tukey, para determinar a comparação múltipla entre médias, através do programa estatístico Minitab (Machado e Zonta, 1991).

2.4 Avaliação microbiológica

As análises microbiológicas realizadas foram: a contagem total em placas, contagem de enterobactérias (coliformes totais e coliformes fecais) e bactérias do gênero *Pseudomonas*, segundo Speck (1984), visando caracterizar o estado inicial da flora microbiana e o seu comportamento em resposta às condições do experimento. A identificação das colônias puras isoladas foi realizada por meio de provas bioquímicas e utilizando-se kits BBL Crystal Identification Systems Enteric/Non Fermenters, fabricado pela Becton Dickinson e kits API 20E da Analytical Products (enterobacteriaceae e outras bactérias gram negativas), fabricado pela bioMérieux.

2.4.1) Contagem total

Para cada determinação, 25 gramas do alface foram asseticamente transferidos para uma jarra de triturador previamente esterilizada do tipo Waring blender e homogeneizados por 3 minutos, com 225mL de água peptonada estéril, a 0,1% para obtenção de uma fina e homogênea pasta. Diluições decimais em série foram preparadas subsequentemente, usando 1mL desta

primeira diluição, em 9mL de água peptonada a 0,1%. As placas com meio de cultura próprio para contagem total (Plate Count Agar /Difco) foram incubadas por 48 horas a 35°C e a leitura foi feita em aparelho contador de colônias Quebec, modelo 3327, fabricado pela American Optical. Os resultados foram expressos em UFC/grama de produto fresco.

b) Contagem de Pseudomonadaceae e Enterobacteriaceae

Para a contagem das bactérias do gênero *Pseudomonas* e das enterobactérias, o preparo da amostra foi similar ao realizado para a contagem total, utilizando-se as diluições, em tubos com tampa rosqueada contendo 9ml de meio de cultura apropriado para cada caso. Para a contagem de *Pseudomonas* foi utilizado o caldo King B e para as enterobactérias foi utilizado o meio Fluorocult caldo LMX, modificado segundo Manafi e Ossmer, para identificação simultânea de coliformes totais e coliformes fecais, incubados em estufa a 35-37°C, durante 24-48 horas. O aparecimento de coloração azul esverdeada após 48 horas nos tubos contendo caldo LMX indicou a presença de coliformes totais, e a presença de fluorescência em luz ultravioleta indicou a presença de coliformes fecais. A contagem foi realizada segundo Speck (1984) através da técnica do número mais provável (NMP). Os resultados foram expressos em NMP/grama de produto fresco.

c) Isolamento e identificação das bactérias

Após a contagem, foram retiradas alçadas (cerca de 0,1ml) dos meios de crescimento, Caldo King B e LMX, e foram realizadas riscagens em placas de Petri contendo ágar King B (King, Ward e Raney, 1954). As colônias foram purificadas por repicagens em meio ágar King B, até a obtenção de colônias puras e, então, transferidas para tubos de ágar King B para posterior

identificação e conservação. As colônias obtidas foram novamente repicadas para tubo inclinado contendo ágar King B, observadas em microscópio quanto a sua motilidade e, através de fitas reativas Bactident (Merck), foram analisadas quanto a sua ação oxidase. A verificação de seu metabolismo (fermentativo e/ou oxidativo) foi realizada em ágar Hugh e Leifson (1953), usando-se D-glicose como fonte de carbono. O procedimento para identificação das bactérias foi feito através de provas bioquímicas e em kits de identificação BBL Crystal Identification Systems Enteric/Non Fermenters, fabricado pela Becton Dickinson e kits API 20E da Analytical Products (enterobacteriaceae e outras bactérias gram negativas), fabricados pela bioMérieux.

2.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento realizado foi um delineamento fatorial com 2 tratamentos, cinco datas de avaliação, 3 repetições, em duplicata. As análises de variância das características físico-químicas e químicas avaliadas foram efetuadas através de programa estatístico SANEST (Machado e Zonta, 1991). A análise de regressão, a comparação múltipla das médias e a correlação de Pearson entre as características avaliadas, foram realizadas através de teste de Tukey ao nível de 1 e 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Acidez

O comportamento da acidez foi semelhante para as duas temperaturas observando-se uma elevação até o 10º dia de armazenamento e depois um ligeiro declínio (Figura 1).

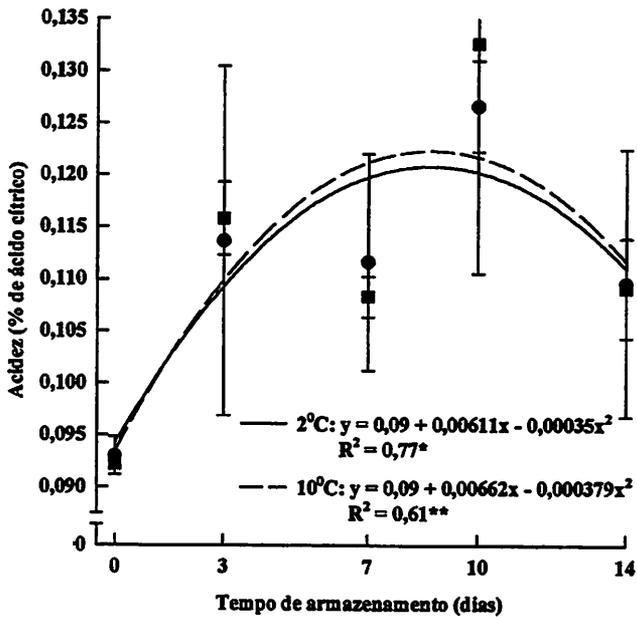


FIGURA 1. Acidez em alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Pela análise estatística, não se observou efeito significativo da temperatura sobre a acidez, quando aplicado o teste de Tukey a 5%. Entretanto, o efeito do tempo de armazenamento na acidez do produto foi significativo para as duas temperaturas, mas não houve efeito significativo na interação tempo e temperatura de armazenamento.

Na tabela A1, apresenta-se o resumo da análise de variância das características físico-químicas, químicas e bioquímicas analisadas.

Bolin e Huxsoll (1991), estudando alface cv. Iceberg minimamente processada e armazenada em sacos plásticos a 2° C, relatam que a acidez e os açúcares, nas saladas de alface cortadas, não variaram durante o armazenamento por 21 dias. Os valores da acidez encontrados pelos autores, expressos em % de ácido cítrico, foram de 0,50.

Os resultados deste experimento são diferentes daqueles obtidos por Bolin e Huxsoll (1991). Para a cultivar hidropônica Regina, estes valores estiveram entre 0,09 e 0,13%, bem menores que aqueles encontrados para a cv. Iceberg. Esta diferença encontrada deve estar relacionada, provavelmente, com o sistema de cultivo e as condições pré-colheita.

1.2 pH

Observa-se que na temperatura de 2°C, não houve alteração nos valores de pH. Após leve diminuição até o terceiro dia, os valores permaneceram constantes e próximos a 5,90. Já na temperatura de 10°C, os valores apresentaram uma leve diminuição até o sétimo dia de armazenamento, quando tiveram um aumento acentuado, após o décimo dia, atingindo 6,54 (Figura 2).

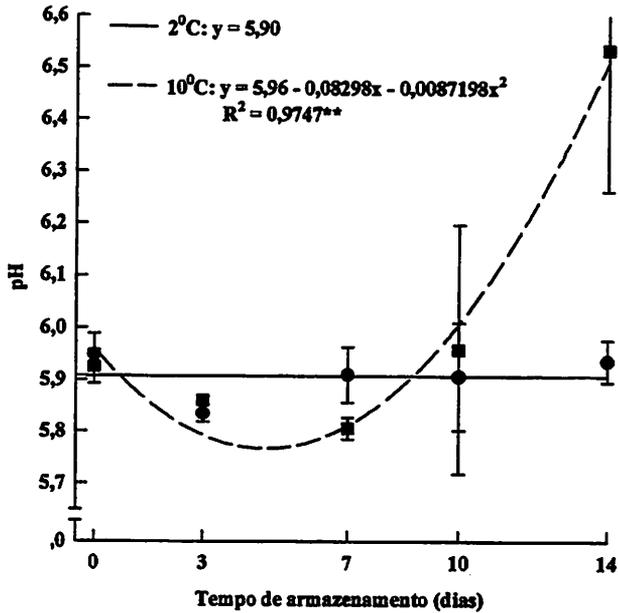


FIGURA 2. pH em alface hidropônica, cv. Regina, minimamente processada e embalada em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Pela análise estatística, houve efeito significativo do tempo de armazenamento a 10°C bem como na interação dos efeitos de tempo e temperatura. Não houve efeito significativo do tempo de armazenamento na temperatura de 2°C.

Os valores de pH encontrados por Bolin e Huxsoll (1991) para a cultivar Iceberg minimamente processada e armazenada em sacos plásticos à 2°C, foram de 6.03, e não variavam durante o armazenamento. Para este experimento realizado com a cv. Regina, os resultados encontrados apresentaram comportamento semelhante, com valores próximos a 5.91, e não apresentaram variação na mesma temperatura de armazenamento. Na temperatura de armazenamento de 10°C, após o décimo dia, as diferenças dos valores de pH

foram acentuadas, tendo em vista que a temperatura mais elevada pode ter favorecido todas as reações metabólicas, como uma possível formação de compostos secundários durante o processo de deterioração do produto.

Os resultados encontrados na temperatura de 2°C também estão de acordo com os experimentos executados por Singh, Wang e Salunkhe (1972), que utilizaram a cv. *Great Lakes*, sob atmosfera controlada (2,5% de O₂ e 2,5% de CO₂) e temperatura de armazenamento de 3°C, e relatam que não houve aumento significativo no pH do alface armazenado.

Tais resultados reforçam o efeito da baixa temperatura na manutenção das principais características e na qualidade final do alface pré-cortado.

4.3 Dióxido de carbono (CO₂)

Observou-se tendência normal a um acúmulo na concentração deste gás devido à respiração do produto e à baixa permeabilidade da embalagem ao CO₂.

A taxa de variação da concentração de CO₂ foi menor à temperatura de 2°C. Nesta temperatura, observou-se uma tendência de estabilização após o sétimo dia de armazenamento, sugerindo um possível estado de equilíbrio. Para a temperatura de 10°C, observou-se um aumento mais acentuado na concentração de CO₂, atingindo, no final do armazenamento, valores próximos a 10.3%. Os resultados encontrados estão de acordo com o previsto, pois quanto menor a temperatura, menor a taxa de respiração de um produto vegetal, justificando, assim a inclinação das curvas de evolução do CO₂ (Figura 3).

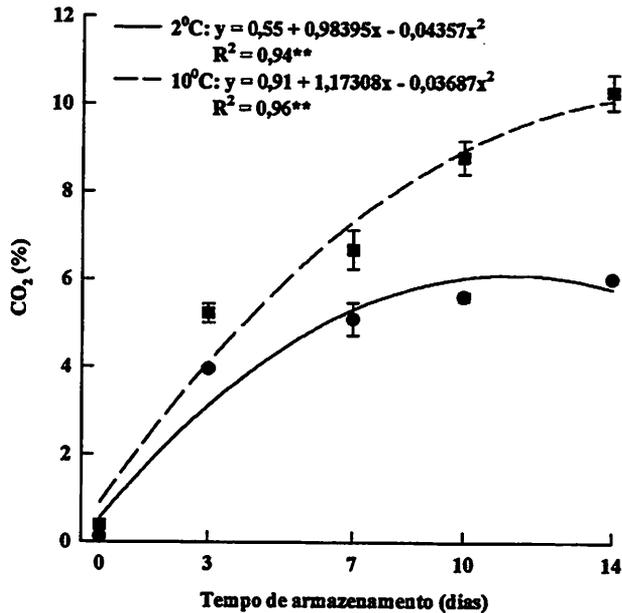


FIGURA 3. Teor de CO₂ na atmosfera da embalagem contendo alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Pela análise estatística, verificou-se efeito significativo da temperatura e do tempo de armazenamento, bem como na interação dos efeitos de tempo e temperatura, na variação do CO₂.

Singh, Wang e Salunkhe (1972), estudando a cv. *Great Lakes*, sob atmosfera controlada (2,5% de O₂ e 2,5% de CO₂) e temperatura de armazenamento de 3°C, observaram que o alface armazenado nestas condições manteve uma melhor qualidade se comparado ao armazenado no ar ambiente, sob a mesma temperatura. Os autores mostraram o efeito benéfico do CO₂ na qualidade do produto.

Neste experimento, para a temperatura de 2°C, houve uma tendência ao equilíbrio, quando o teor de CO₂ esteve próximo a 6%. Este valor está próximo

os encontrados e sugeridos por Ballantyne, Stark e Selman, (1988b) e por Heimdal et al. (1995) para a obtenção da melhor qualidade do produto. Este teor de CO₂, junto com a temperatura de armazenamento, provavelmente retardaram o aparecimento das características indesejáveis, como o escurecimento de margens e das bordas, afetando a atividade das enzimas envolvidas com a evolução do CO₂ na respiração, tais como a enzima piruvato descarboxilase e a amilase (Littlefield, 1968). O aumento na concentração de CO₂ inibe diretamente a atividade de diversas enzimas envolvidas na respiração (Siriphanic e Kader 1985).

Wiley (1994), estudando alface minimamente processado, verificou que devido aos valores do pH intracelular serem normalmente regulados dentro de limites estreitos, somente concentrações elevadas de CO₂ (maiores que 5%) poderão diminuir o pH intracelular.

Se elevadas concentrações de CO₂ podem diminuir o pH intracelular em tecidos de plantas, isto poderá mudar as atividades de várias enzimas e a distribuição de auxinas, giberelinas, etileno e alguns ácidos orgânicos. Neste experimento, não foi observada influência da quantidade de CO₂ na diminuição do pH (Figura 2). No armazenamento a 10°C, após dez dias, apesar da elevada concentração de CO₂, observou-se uma elevação dos valores do pH, coincidindo com a formação de alguns compostos secundários escuros, provavelmente xantofinas (Figura 2).

4.4 Clorofila total

Verificou-se um decréscimo na quantidade de clorofila total durante o armazenamento, para as duas temperaturas, sendo mais intenso nos três primeiros dias. Os valores iniciais encontram-se próximos a 213 mg de clorofila por 100 gramas de amostra. Para a temperatura de 2°C, observou-se um

decréscimo menos acentuado, com menor degradação da clorofila, atingindo valores próximos a 150 mg. Nesta temperatura, a menor degradação da clorofila total pode ser atribuída à menor atividade metabólica em temperaturas mais baixas. Para a temperatura de 10°C, observou-se, além do decréscimo mais acentuado, um ponto mínimo no sétimo dia, próximo a 130 mg. Após o sétimo dia, verificou-se um aumento bem acentuado até atingir 180 mg, ao final do tempo de armazenamento (Figura 4). Este aumento pode estar associado à possível formação de feofitinas ou outros compostos secundários escuros, que seriam detectados na leitura ótica sob o mesmo comprimento de onda.

Na análise estatística, verificou-se efeito significativo da temperatura e do tempo de armazenamento, bem como na interação dos efeitos de tempo e temperatura na degradação da clorofila.

Os resultados reportados por Watada, Abe e Yamauchi, (1990) indicam que as vias da degradação da clorofila diferem entre espécies de plantas e ainda é desconhecido o papel do etileno na ativação de outras vias de degradação. Altas concentrações de CO₂ causam toxicidade através da dissolução dos líquidos celulares, com uma diminuição do pH que pode acarretar outras desordens fisiológicas e degradação de membranas. A destruição da clorofila que leva ao amarelecimento indesejável em hortaliças folhosas, pode ser uma consequência destas mudanças de pH.

Segundo Yamauchi e Watada (1991), a degradação da clorofila constitui um bom indicador da condição fisiológica de tecidos de órgãos verdes.

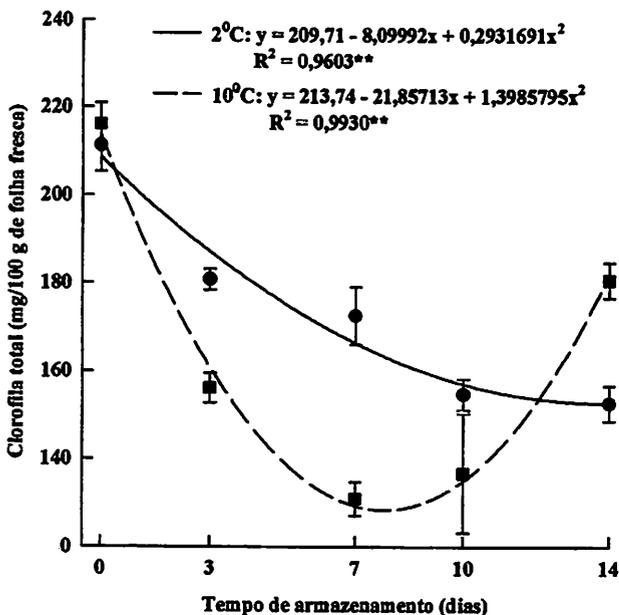


FIGURA 4. Teor de clorofila em alface hidropônica, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

3.5 Polifenoloxidase (PFO)

Observou-se pequeno aumento linear da atividade da enzima à 2°C, com valores iniciais de 15,6 U.min⁻¹.g⁻¹, atingindo 58,3 U.min⁻¹.g⁻¹ no final do armazenamento. À 10°C, após o décimo dia, verificou-se elevado aumento na atividade da enzima, atingindo valores próximos a 215 U.min⁻¹.g⁻¹, bem superiores aos valores encontrados à temperatura de 2°C (Figura 5).

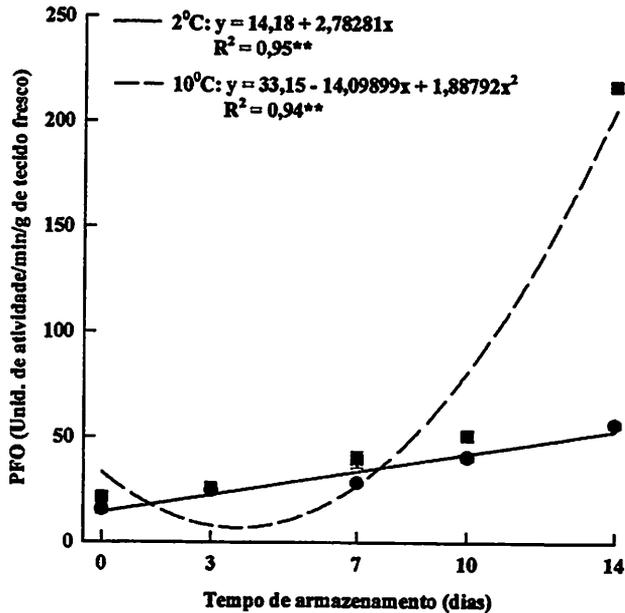


FIGURA 5. Atividade da enzima polifenoloxidase em alfaca hidropônico, cv Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Observou-se que na temperatura mais baixa, a atividade enzimática é menor, já que as reações bioquímicas catalizadas por enzimas apresentam-se conforme a lei de Arrhenius.

Pela análise estatística, verificou-se efeito significativo da temperatura e do tempo de armazenamento, bem como na interação dos efeitos de tempo e temperatura na atividade desta enzima.

Segundo Ke e Saltveit (1989a), o aumento do teor de CO₂ induz a atividade de enzima fenilalanina amônia-liase que, por sua vez, aumenta a produção de ácido cinâmico e seus derivados, que serão metabolizados a compostos fenólicos solúveis e utilizados como substrato pela PFO, causando o escurecimento.

No armazenamento a 10°C, o comportamento da PFO foi diretamente correlacionado com o escurecimento do alface, que após o décimo dia, foi mais acentuado (Figuras 9 e 10) devido, provavelmente, segundo Ke e Saltveit (1989a), ao teor de fenólicos solúveis, como a catequina, epicatequina, ácido clorogênico e seus derivados e a oxidação destes compostos, pela polifenoloxidase.

Segundo Nicolas et al. (1994), nenhuma relação simples entre escurecimento, teor de fenólicos e/ou polifenoloxidase foi encontrada para frutas e hortaliças. Uma razão para tal, segundo o autor, pode ser o uso de métodos inadequados para avaliação do escurecimento. Outra razão pode ser a maior complexidade e o não completo entendimento das interações entre substratos fenólicos, co-substratos, antioxidantes, atividades enzimáticas e a polimerização química que resulta nas reações de escurecimento. Diferentes cultivares de alface não apresentam idênticas atividades de escurecimento quando cortados e armazenados sob atmosfera controlada (Ke e Saltveit, 1989c; Couture, Cantwell e Saltveit, 1993).

Neste experimento, realizado com alface hidropônica, o comportamento da PFO foi diferente daqueles relatados por Murr e Morris (1974) que, estudando o escurecimento de cogumelos, reportam uma possível inibição competitiva da atividade desta enzima pelo CO₂. Segundo Siriphanich e Kader (1985), o CO₂ não tem efeito muito claro sobre a atividade da polifenoloxidase. Em alface hidropônica, a inibição direta desta enzima pelo CO₂ não foi demonstrada.

6 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

Verificou-se aumento na atividade desta enzima durante o armazenamento, para ambas as temperaturas. Os valores iniciais estavam

próximos de $0,4 \text{ U.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$, atingindo valores finais de $1,4 \text{ U.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e $1,9 \text{ U.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ respectivamente a 2°C e 10°C (Figura 6).

Na análise estatística, verificou-se efeito significativo da temperatura do tempo de armazenamento, bem como na interação dos efeitos de tempo temperatura na atividade desta enzima.

Mateos et al. (1993b) observaram que a exposição de pedaços de nervura central da cv. Salinas, à $2,5^{\circ}\text{C}$ e uma atmosfera acima de 20% de CO_2 aumentam a quantidade de FAL extraída quando realizada em seu pH ótimo (8.5). Em pH mais baixo, como 6.3, a extração desta enzima foi menor. Os autores reportaram que o teor total de fenólicos das nervuras cortadas armazenadas sob atmosfera de 20% de CO_2 , foi reduzido, bem como foi menor a atividade da FAL, devido a uma diminuição do pH citoplasmático.

No experimento realizado, à temperatura de armazenamento de 2°C observou-se nenhuma variação do pH, com valores próximos a 5.9, e uma concentração de CO_2 em torno de 6%, não favorecendo uma maior atividade da FAL. Na temperatura de 10°C , isto não ocorreu; a variação do pH pode estar induzindo maior atividade desta enzima, bem como da polifenoloxidase. Portanto, a redução da atividade da FAL pode ter ocorrido quando o pH citoplasmático se distanciou do seu ótimo.

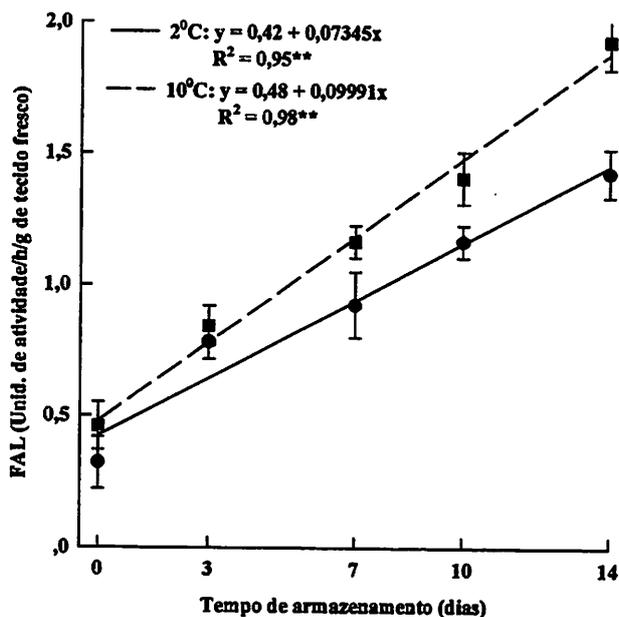


FIGURA 6. Atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase em alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

López-Gálvez, Saltveit e Cantwell, (1996b) estudaram o comportamento da FAL em duas temperaturas de armazenamento (5°C e a 15°C) e verificaram que a atividade aumenta quando o tamanho dos pedaços das nervuras picadas de alface diminui. Segundo os autores, dependendo do tamanho dos pedaços do alface cortado, a atividade da FAL atinge um nível máximo entre 6 a 16 horas, a 5°C. Na temperatura de 5°C, são necessários períodos mais longos para que o nível máximo seja atingido. A atividade da FAL induzida pelo fermento aparece após 4 horas, alcança a máxima atividade em cerca de 24 horas, e então diminui lentamente, até atingir os níveis normais em uma semana.

Segundo Ritenour, Harens e Saltveit (1995), o processo que leva a um aumento na atividade da FAL, como transcrição, tradução e qualquer

modificação protéica ou ativação, ocorre mais rapidamente em temperatura mais elevadas, justificando, assim, as diferenças encontradas neste experimento para os valores da atividade desta enzima nos produtos armazenados a 2 e 10°C.

Parece claro que algumas reações bioquímicas comuns, como a indução da FAL e o acúmulo e oxidação de compostos fenólicos solúveis pela polifenoloxidase, estão envolvidos no desenvolvimento de manchas marrons e outras desordens fisiológicas.

4.7 Correlação entre as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas

Através do programa estatístico SANEST, foi determinada a correlação linear (correlações de Pearson) entre as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas dentro de cada temperatura de armazenamento (Tabelas A2 e A3).

Em relação a acidez do produto, para ambas as temperaturas de armazenamento, houve uma correlação significativa entre o comportamento da acidez sobre o efeito do CO₂ e na quantidade de clorofila. O efeito da acidez no pH e na atividade da enzima PFO foi não significativo. Na temperatura de 2°C, houve um efeito significativo sobre a atividade da enzima FAL, o que não ocorreu no produto armazenado a 10°C.

Não houve associação ou correlação significativa na variação do pH e os efeitos de todas as outras variáveis nos produtos armazenados a 2°C. Isto sugere que, nesta temperatura, não há variação significativa nos valores de pH, independente do comportamento das outras variáveis. Nos produtos armazenados a 10°C, houve efeito significativo do pH nas atividades das enzimas PFO e da FAL e da quantidade de CO₂ presente no interior das embalagens. Nesta temperatura, os efeitos da acidez e da clorofila foram não significativos.

Observou-se que na evolução do CO₂, para ambas as temperaturas de armazenamento, houve uma alta correlação entre a quantidade de CO₂ e o efeito em todas as outras variáveis, exceto para a variação do pH, na temperatura de 2°C, que foi não significativo.

Em relação à clorofila total, para a temperatura de armazenamento de 2°C, houve uma alta correlação negativa entre a quantidade total de clorofila e os efeitos das atividades das enzimas PFO, FAL, da quantidade de CO₂ e da variação da acidez. O efeito da quantidade de clorofila sobre o pH, foi não significativo. Para a temperatura de armazenamento de 10°C, também se observou um efeito significativo para o CO₂ e para acidez, e um efeito não significativo para o pH. Não houve efeito significativo para a atividade das enzimas PFO e FAL. Este resultado, provavelmente, pode ser devido ao comportamento da quantidade de clorofila total, lida em espectrofotômetro, que entre 7 e 10 dias de armazenamento apresentou valores mais elevados.

Na atividade da enzima PFO, observou-se que tanto no armazenamento a 2°C como no armazenamento a 10°C, houve uma alta associação positiva entre a atividade da PFO e o efeito da atividade da enzima FAL, da evolução do CO₂, e uma alta associação negativa sobre a quantidade de clorofila total, no armazenamento a 2°C. A 2°C, não houve variação significativa do efeito da acidez e do pH. No armazenamento do produto a 10°C, o efeito da clorofila e da acidez não foi significativo e o efeito do pH foi significativo. Nesta temperatura, observou-se que a partir do décimo dia, a quantidade de clorofila e o comportamento do pH apresentaram um aumento acentuado, coincidindo também com um aumento acentuado na atividade da enzima PFO, o que provavelmente poderá ter causado influência na sua correlação.

Em relação à atividade da FAL, observou-se que na temperatura de armazenamento de 2°C, houve uma alta associação dos efeitos das outras variáveis, com exceção do pH. No produto armazenado a 10°C, houve uma

correlação significativa no efeitos de pH, do CO₂ e da atividade da enzima PFO. Não houve correlação significativa nos efeitos da acidez e da clorofila.

Observando-se, de uma forma geral, verifica-se que a 2°C de armazenamento, não houve influência da acidez, a variação do pH não foi significativa, e existe uma alta associação no comportamento da clorofila, do CO₂ e das enzimas PFO e FAL. No armazenamento a 10°C, também não houve influência da acidez, a variação da clorofila não foi significativa, pela formação de compostos secundários, no processo de deterioração do produto, e existe uma alta associação no comportamento do pH, do CO₂, e das enzimas PFO e FAL. Verificou-se, portanto, que para a temperatura de armazenamento de 10°C, o pH teve uma variação significativa e poderá estar influenciando ou sendo influenciado, pelo comportamento das outras variáveis, principalmente o CO₂ e as enzimas FAL e PFO.

4.8 Avaliação sensorial

A análise estatística mostrou que a temperatura, o tempo de armazenamento e a interação tempo-temperatura afetaram significativamente todos os atributos sensoriais estudados relacionados com a aparência.

O resumo da análise de variância para os atributos sensoriais estudados estão na Tabela A4.

4.8.1 Cor

Pela média das notas atribuídas pelos provadores, observou-se que até o terceiro dia não houve alteração perceptível da cor do alface minimamente processado, nas duas temperaturas de armazenamento (Figura 7). Após o sétimo dia, as diferenças na cor em ambas as temperaturas foram perceptíveis, sendo

nuito menos acentuada à temperatura de 2°C. Nesta temperatura, até o décimo dia de armazenamento, não houve diferença significativa na cor do produto. Alguma alteração somente ocorreu no décimo quarto dia, porém de forma pouco acentuada. À temperatura de 10°C, após o sétimo dia, houve uma queda na cor característica do alface, evidenciando uma perda na qualidade. Nesta temperatura, após o décimo dia, a cor do alface ficou descaracterizada (Figura 7). A alteração da cor pode ser atribuída à degradação da clorofila e a formação de compostos secundários, o que reduz sensivelmente a qualidade do produto.

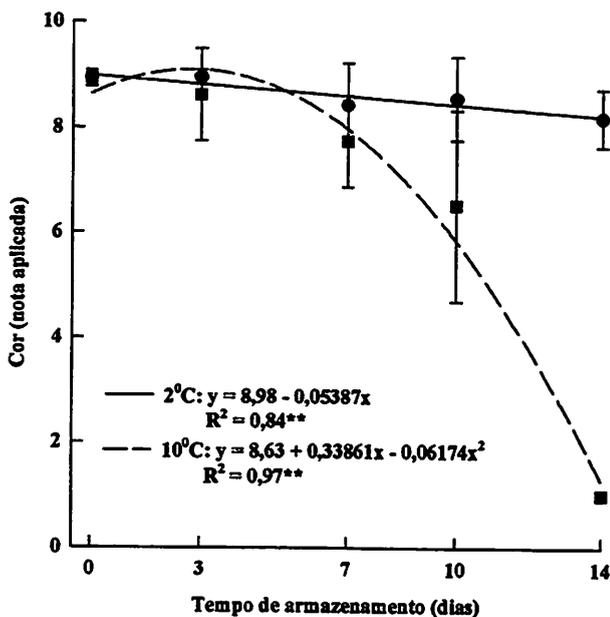


FIGURA 7. Alteração da cor em alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

4.8.2 Frescor

Neste atributo, observou-se que até o terceiro dia, também não houve alteração no frescor do produto, nas duas temperaturas de armazenamento (Figura 8). À temperatura de 2°C, até o décimo dia de armazenamento observou-se pouca variação no frescor do produto. A partir o sétimo dia, ocorreu redução neste atributo, sendo muito mais acentuada à temperatura de 10°C. Nesta temperatura, notadamente após o sétimo dia, o produto perdeu significativamente o seu frescor.

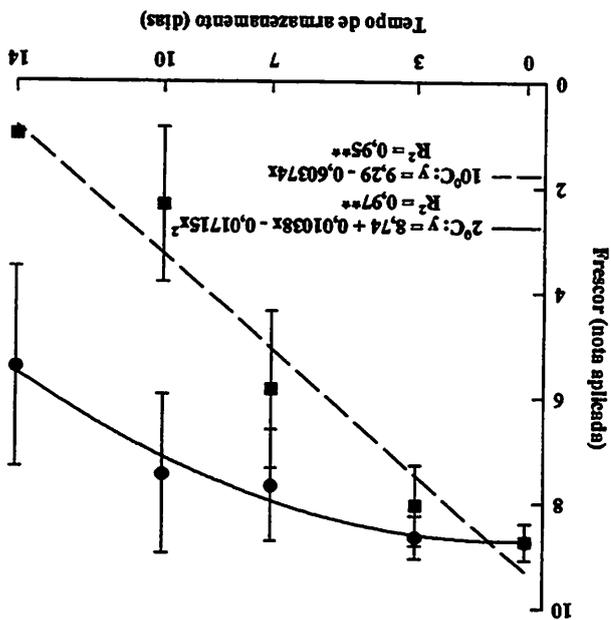


FIGURA 8. Alteração do frescor em alface hidropônica, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Os padrões respiratórios para hortaliças em resposta às temperaturas mais baixas são variáveis. No caso específico do alface, como existe tolerância às temperaturas próximas a 2°C, verificou-se que o frescor nesta temperatura foi praticamente mantido até o sétimo dia. Verifica-se que o frescor a partir do sétimo dia de armazenamento manteve-se constante para o alface a 2°C, o que não ocorreu quando armazenado a 10°C (Figura 8). A temperatura mais baixa propiciou um taxa respiratória adequada para propiciar equilíbrio com a glicólise, mantendo um metabolismo normal, conforme constatado por Lyons (1973) em hortaliças tolerantes ao *chilling*. Este fato não ocorreu à temperatura de 10°C, pois no sétimo dia de armazenamento a nota 6 atribuída pelos provadores foi tida como perda de frescor e, conseqüentemente, do valor comercial.

8.3 Escurecimento da nervura central

Até o terceiro dia, observou-se que também não houve diferença no escurecimento da nervura central do produto, para as duas temperaturas de armazenamento. Após o sétimo dia, verificou-se um aumento no escurecimento, sendo mais acentuado a 10°C. No armazenamento do produto a 2°C, o escurecimento da nervura central só foi acentuado após o décimo dia, enquanto que a 10°C, isto já ocorreu após o sétimo dia (Figura 9).

Mateos et al. (1993b) relatam que a exposição do alface a teores elevados de CO₂ pode causar desordem denominada mancha marrom, parecendo primeiramente na superfície da nervura central da folha como uma mancha amarelada e umedecida, com tamanho variável, tornando-se mais definida e marrom. Ainda segundo Mateos et al. (1993a), para o alface minimamente processado, o escurecimento é mais severo quando o tecido é armazenado ao ar,

mas, sob atmosfera com 5% e 10% de CO₂, esta desordem é inibida ou reduzida sendo que, nestas condições, nenhuma mancha marrom foi observada nos tecidos das folhas verdes. Entretanto, o tratamento com 20% de CO₂ causou escurecimento nos tecidos das folhas verdes processadas.

Apesar dos fermentos ou cortes induzirem o escurecimento, e serem fatores limitantes para a conservação de hortaliças minimamente processadas, a temperatura de 2°C foi eficiente para evitar, até o décimo dia, o escurecimento indesejável da nervura central, o que não ocorreu à temperatura de 10°C.

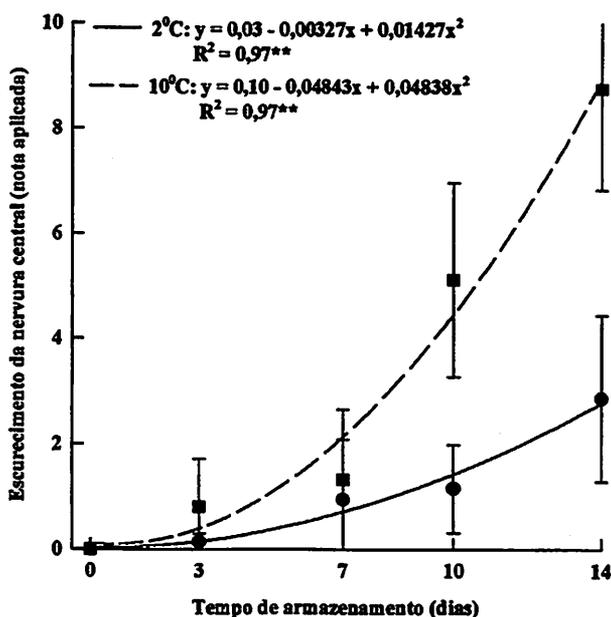


FIGURA 9. Escurecimento da nervura central em alface hidropônica, cv Regina, minimamente processada, embalada em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

4.8.4 Escurecimento das bordas

Também não foram observados diferenças no escurecimento das bordas do produto, até o terceiro dia, para as duas temperaturas de armazenamento (Figura 10). No produto armazenado a 2°C, observou-se escurecimento mais lento e gradual, sendo que, até o décimo dia, o produto não apresentou diferenças significativas no grau de escurecimento, mantendo-se com boa qualidade. No produto armazenado a 10°C, ocorreu um aumento constante e mais acentuado no escurecimento, sendo que, após o terceiro dia, este atributo ficou bem evidenciado, comprometendo a qualidade do produto (Figura 10).

Segundo López-Gálvez, Saltveit e Cantwell (1996a), dentre os diferentes componentes que interferem na aparência do alface pré-cortado, o escurecimento da superfície da folha e o das bordas são os maiores defeitos que levam à diminuição da qualidade das saladas produzidas com alface pré-cortado, na ausência da desordem denominada *russet spotting*. Se a cultivar usada na preparação da salada for susceptível ao *russet spotting*, esta desordem pode afetar seriamente a qualidade visual do produto. No experimento realizado com a cultivar hidropônica Regina, em ambas as temperaturas de armazenamento, não se observou nenhum sintoma de *russet spotting*.

Segundo Heimdal et al. (1995), os melhores resultados encontrados para um menor grau de escurecimento e uma melhor qualidade visual ocorreram quando a atmosfera de equilíbrio da embalagem alcançou 1-3% de O₂ e 5-6% de CO₂, em concordância com Ballantyne, Stark e Selman, (1988b).

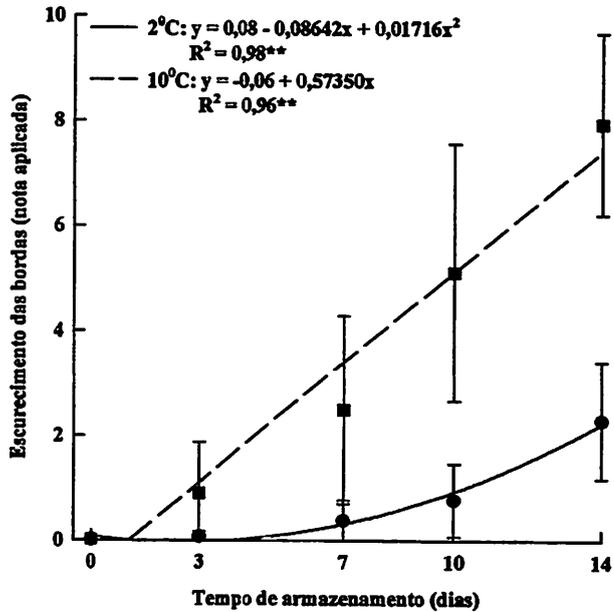


FIGURA 10. Escurecimento das bordas em alface hidropônica, cv. Regina minimamente processada, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Varoquax, Mazollier e Albagnac (1996) analisaram a correlação entre o aparecimento de manchas marrons no alface cortado e a concentração de CO₂ e verificaram que as mesmas somente ocorreram em concentrações superiores a 7,5% de CO₂, independente da cultivar estudada. Os autores citaram que o coeficiente de regressão encontrado ($r = 0,93$) ilustra a estreita relação entre a concentração de CO₂ e a avaliação visual das folhas.

Relacionando o escurecimento das folhas com os teores de CO₂ existentes no interior das embalagens, os resultados encontrados estão de acordo com Heimdal et al. (1995) e Varoquax, Mazollier e Albagnac (1996). No armazenamento a 10°C, após o sétimo dia, a diferença no escurecimento foi

significativa quando comparada ao produto armazenado a 2°C e os seus respectivos teores de CO₂ (Figura 3).

8.5 Cozido

Observou-se que até o sétimo dia, não houve diferença significativa, este atributo, entre as duas temperaturas de armazenamento (Figura 11).

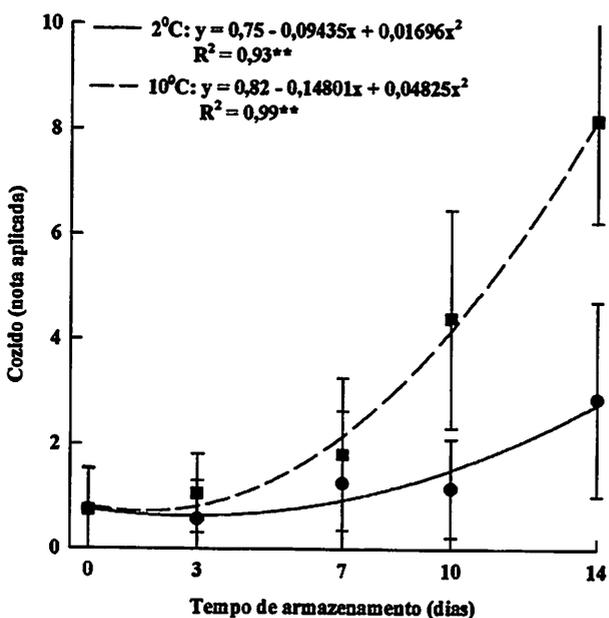


FIGURA 11. Alteração do atributo cozido em alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

No produto armazenado a 2°C, não ocorreu diferença significativa até décimo dia, enquanto que, para o armazenamento a 10°C, esta diferença foi mais acentuada após sete dias.

López-Gálvez, Saltveit e Cantwell (1996a) e Siriphanic e Kader (1985), estudando diferentes cultivares de alface, verificaram que o amolecimento e a descoloração generalizada constituíram-se as principais injúrias causadas pelas elevadas concentrações de CO₂.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que, quando armazenados a 10°C, os níveis de CO₂ aumentaram em proporções consideráveis. Observou-se, também, que o material de embalagem utilizado evitou a perda de umidade, via evaporação, retardando o murchamento ou perda do turgor do produto, ajudando a manter a sua qualidade. É possível que o principal fator de alteração do atributo cozido tenha sido a elevação do teor de CO₂, a temperatura de 10°C, conforme constatado por López-Gálvez, Saltveit e Cantwell (1996a) e por Siriphanic e Kader (1985).

4.8.6 Podre

No produto armazenado a 2°C, não ocorreu diferença significativa até décimo quarto dia, mantendo o produto praticamente isento desta característica, enquanto, para o armazenamento a 10°C, houve diferença acentuada após o terceiro dia (Figura 12).

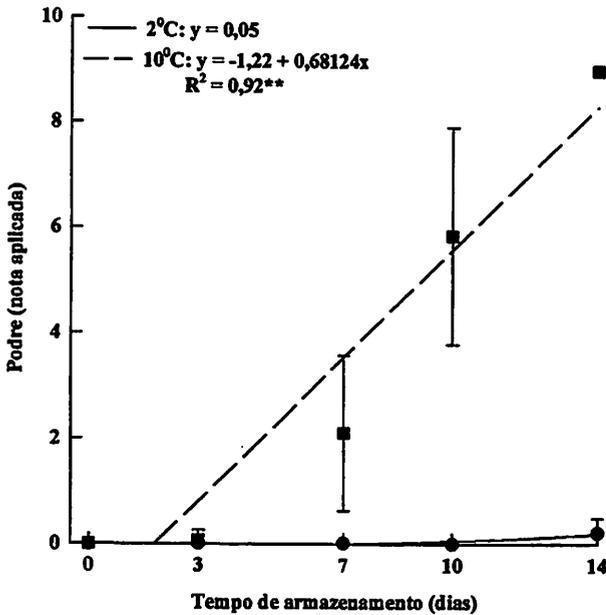


FIGURA 12. Alteração do atributo podre em alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Observa-se que o teor de clorofila, já no terceiro dia do armazenamento, apresentou concentrações bem reduzidas, indicando possivelmente uma atuação intensiva da clorofilase. Associado à perda da cor verde (Figura 7), verifica-se que o escurecimento foi ainda mais acentuado, já em decorrência da formação dos produtos do metabolismo dos fenilpropanóides, como os fenólicos e outros substratos, como as antocianinas, que são oxidadas em reações catalizadas por enzimas como polifenoloxidasas ou peroxidases.

4.8.7 Impressão global da aparência

Até o terceiro dia, não houve diferença significativa neste atributo, para as duas temperaturas de armazenamento (Figura 13). A partir do terceiro dia observou-se diferença na impressão global da aparência do produto armazenado nas diferentes temperaturas. No armazenamento a 2°C, o produto permaneceu em boas condições até por 10 dias, com uma queda gradual e mais lenta na sua qualidade. Para o produto armazenado a 10°C, após o sétimo dia, notou-se uma grande e acentuada diminuição na sua qualidade (Figura 13).

Tais resultados estão em concordância com Bolin et al. (1977), que reportam que o armazenamento à baixa temperatura é um importante método de preservação para produtos minimamente processados, como o alface cortado da cultivar Iceberg. Segundo os autores, a temperatura influencia fortemente a vida útil do alface cortado. Alfaces armazenados a 5 ou 10°C apresentaram estatisticamente, um tempo de armazenamento menor que aqueles mantidos a 2°C. Segundo o autor, o alface mantido a 2°C permaneceu com qualidade comercial por 20 dias, comparável aos 10 dias do mesmo produto mantido a 10°C, representando um aumento de mais de 100%. Para a alface hidropônica, como foi citado, este tempo de armazenamento foi menor, atingindo 10 dias no armazenamento a 2°C, e no máximo, três dias no armazenamento a 10°C.

McDonald, Risse e Barmore, (1990) estudaram a alface crespa cortada cv. Salinas utilizando diferentes filmes plásticos, armazenadas à 1 e 5°C, por 14 dias, e reportaram que a aparência e o *flavor* foram mais afetados pela temperatura do que pelo tempo do armazenamento, em três dos quatro tipos de filme utilizados.

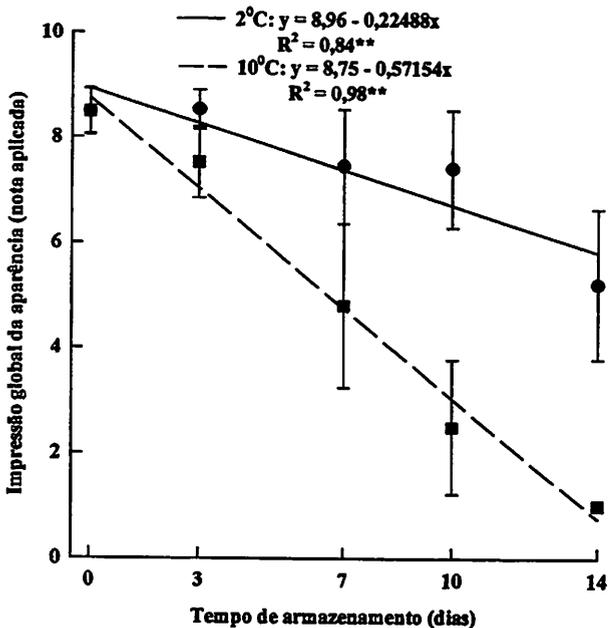


FIGURA 13. Impressão geral da aparência em alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em saco plástico termosoldado, durante armazenamento a 2°C e 10°C.

Os resultados encontrados neste experimento também estão de acordo com McDonald, Risse e Barmore, (1990), que reportam que alface cortado e mantido a 5°C tem uma vida útil significativamente menor, determinado pela aparência e avaliação do *flavor*, do que o alface mantido a 1°C.

9 Correlação entre as variáveis sensoriais

Através do programa estatístico SANEST, foi determinada a correlação linear (correlações de Pearson) entre os atributos sensoriais, para cada temperatura de armazenamento (Anexos A 5 e A 6).

Observou-se que para ambas temperaturas de armazenamento, houve correlação significativa entre todos os atributos. A cor apresentou uma alta associação positiva com frescor e a impressão geral da aparência e uma alta associação negativa com escurecimento da nervura central, escurecimento das bordas e com os atributos cozido e podre. Da mesma maneira, o frescor do produto apresentou uma alta associação positiva com a cor e a impressão geral da aparência e uma alta associação negativa com todos os demais atributos avaliados. O escurecimento da nervura central, o escurecimento das bordas, o aspecto cozido e podre apresentaram altas correlações positivas entre si e negativas em relação à cor, frescor e à impressão global da aparência.

As médias das notas atribuídas pelos provadores mostraram que no armazenamento a 2°C, os primeiros sinais de deterioração na qualidade do produto iniciam-se pelo atributo cozido, seguido pelo escurecimento da nervura central, escurecimento de bordas e do aspecto podre, enquanto que a 10°C, o atributo cozido foi o sinal mais evidente somente até o terceiro dia. Após este período, o escurecimento da nervura central, o escurecimento de bordas e o aspecto podre aparecem praticamente juntos.

4.10 Correlação entre as variáveis sensoriais e as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas

Através do mesmo programa estatístico, foi determinada a correlação linear entre as variáveis sensoriais, físico-químicas e químicas dentro de cada temperatura de armazenamento (Anexos A 7, A 8, A 9 e A 10).

Em ambas as temperaturas de armazenamento, não houve correlação significativa da acidez sobre todos os atributos sensoriais. A clorofila apresentou correlação significativa com a cor e frescor somente no produto armazenado a 2°C, sendo não significativa a 10°C, provavelmente devido ao comportamento

da clorofila durante o período de armazenamento. Observou-se uma alta correlação entre a concentração de CO₂ e todos os atributos sensoriais, na temperatura de armazenamento de 10°C. No produto armazenado a 2°C, somente a cor apresentou correlação significativa com a concentração de CO₂, e nenhum outro atributo sensorial apresentou correlação significativa, sugerindo que na temperatura mais elevada, o efeito do CO₂ ficou mais evidente. A atividade da enzima FAL está correlacionada significativamente com todos os atributos sensoriais nas duas temperaturas de armazenamento, sendo que, na temperatura de 10°C, os coeficientes de correlação são bem maiores. Na temperatura de 2°C, não houve correlação significativa entre o pH e os atributos sensoriais. Para o armazenamento a 10°C, houve uma correlação significativa do pH e os atributos sensoriais, exceto o frescor e a impressão geral da aparência. Em relação à enzima PFO, nas duas temperaturas de armazenamento, observou-se, como na FAL, uma alta associação positiva entre sua atividade e todos os atributos sensoriais. Tanto a FAL quanto a PFO apresentaram associação negativa em relação à cor, ao frescor e à impressão geral da aparência.

As médias das notas atribuídas pelos provadores mostraram que o escurecimento da nervura central foi mais intenso que o escurecimento das bordas, alcançando valores superiores, nos mesmos períodos de tempo, em ambas as temperaturas. Estas médias também mostraram que a 10°C, após o sétimo dia, quando a concentração de CO₂ atingiu valores próximos de 6%, o escurecimento da nervura central e o escurecimento das bordas cresceu centuadamente. Contudo, a 2°C, somente após o décimo dia, observou-se aumento no escurecimento da nervura central e do escurecimento de bordas, sendo bem menor que o do produto armazenado a 10°C.

4.11 Avaliações bacteriológicas

4.11.1 Contagem total, contagem de enterobacteriaceae e de pseudomonadaceae

A contagem de bactérias no produto pode variar significativamente de acordo com os métodos utilizados, incluindo desde o manuseio na fase pré-colheita, tais como, os substratos utilizados nos berçários, qualidade da água e as operações pós-colheita, bem como a remoção das folhas externas, higienização, manuseio dos operadores, das águas utilizadas e das instalações.

Para ambas as temperaturas de armazenamento (Tabelas 2 e 3), a contagem total inicial foi semelhante, na ordem de 10^3 UFC/g, e até o terceiro dia, o número de bactérias aumentou de forma pouco acentuada, atingindo 10^4 UFC/g. Após este período, a 2°C este crescimento foi menos acentuado, atingindo, no final do tempo de armazenamento, valores próximos a 10^6 UFC/g. A 10°C este crescimento foi mais acentuado, atingindo níveis de 10^8 UFC/g após o 14º dia.

TABELA 2. Contagem total, contagem de enterobacteriaceae e de pseudomonadaceae em alface hidropônico, cv. Regina minimamente processado, embalado em sacos plásticos termosoldado, durante armazenamento a 2°C .

	Total (UFC/g)	Enterobacteriaceae (NMP/g)		Pseudomonadaceae (NMP/g)
		Coliformes totais	Coliformes fecais	
0 dias	$7,6 \times 10^3$	240	< 3	7
3 dias	$1,4 \times 10^4$	460	< 3	11
7 dias	$4,8 \times 10^4$	2100	< 3	150
10 dias	$<1,0 \times 10^5$	4000	< 3	1500
14 dias	$8,8 \times 10^5$	>11000	< 3	7500

Os resultados obtidos estão próximos aos encontrados por outros autores, como Nguyen-the e Prunier (1989), que reportam a contagem de bactérias totais em alface fresco e processado, em 8 a 10 dias de armazenamento a 10°C, na faixa de 10^5 a 10^7 UFC/g, e por Pripke, Wer e Nelson (1976), que apontam a contagem total de microrganismos em produtos vegetais cortados, inclusive o alface, acima de 10^8 UFC/g, em 8 a 10 dias de armazenamento a 4°C.

Pode-se observar uma menor contagem na microbiota do produto, refletindo o efeito da temperatura em um menor crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes (Tabelas 2 e 3). Os resultados obtidos estão em concordância com King e Bolin (1989), que demonstram o tempo máximo de vida útil do alface cortado em plantas processadoras, para saladas ou uso em sanduíches e vendidos em sacos plásticos, como sendo de 2 a 3 semanas, dependendo do processamento, embalagem e condições de armazenamento.

TABELA 3. Contagem total, contagem de enterobacteriaceas e de pseudomonadaceas, em alface hidropônico, cv. Regina, minimamente processado, embalado em sacos plásticos termosoldado, durante o período de armazenamento, à 10°C.

	Total (UFC/g)	Enterobacteriaceae (NMP/g)		Pseudomonadaceae (NMP/g)
		Colifomes totais	Coliformes fecais	
0 dias	$7,3 \times 10^3$	93	< 3	7
3 dias	$2,1 \times 10^4$	>1100	< 3	15
7 dias	$> 3,0 \times 10^6$	>11000	280	>11000
10 dias	$1,7 \times 10^8$	>11000	430	>11000
14 dias	$5,2 \times 10^8$	>1100000	43000	110000

Os resultados encontrados divergem de King Jr. et al. (1991), que estudando o efeito de três temperaturas de armazenamento (2°C, 5°C e 7,5°C) sobre o crescimento microbiano, durante um período de 8 dias, não encontraram diferenças na taxa de crescimento de bactérias. Os autores ainda sugerem que uma menor influência da temperatura de armazenamento sobre a taxa de crescimento indica que estas bactérias crescem bem abaixo da sua temperatura ótima.

Neste trabalho, isto não ocorreu, visto que o crescimento a 10°C foi bem mais acentuado, indicando que a população de bactérias em alfaces pode crescer nesta temperatura, após um período de armazenamento, durante o qual a respiração do alface resultou em ambiente favorável a ataques bacterianos nos tecidos da planta. Verificou-se relação entre a ação bacteriana e a qualidade do alface, indicando que a deterioração bacteriana provavelmente seja mais significativa somente na temperatura de armazenagem mais elevada.

A vida útil do alface está relacionada com a fisiologia e a microbiota do produto. O abaixamento da temperatura reduz a respiração e retarda a senescência. A manutenção da temperatura a 1 ou 2°C acima do ponto de congelamento ou acima do ponto em que a injúria pelo frio ocorre pode aumentar a vida útil em pelo menos 3 a 5 vezes ou mais quando comparado ao armazenamento a 10°C.

Em geral, contagens baixas de psicotróficos correlacionam-se à melhor qualidade visual (Barriga et al., 1991). Segundo este autor, em atmosfera à 3% de O₂ + 10% de CO₂, a qualidade visual do alface cortado foi mantida apesar de altas contagens microbiológicas (10⁶ a 10⁷ UFC/g.).

A diferença no crescimento da contagem de enterobactérias, demonstrando a importância da temperatura de armazenamento na qualidade final do produto, pode ser visualizada na Tabela 3. Em relação ao número de coliformes totais, observou-se que no produto armazenado a 2°C, após 14 dias, a

contagem atinge valores semelhantes aos encontrados em até 7 dias, se comparado com o produto armazenado a 10°C. Isto sugere que a 2°C existe uma taxa de crescimento bem inferior, com o aumento do tempo de armazenamento para se atingir um mesmo nível de contagem.

Quanto ao número de coliformes fecais, observou-se que no produto armazenado a 2°C, após 14 dias de armazenamento, o valor da contagem permanece <3 NMP/g, enquanto no produto armazenado a 10°C, estes valores atingem a 43000 NMP/g. É importante salientar que para o produto armazenado a 10°C, ao atingir o sétimo dia, a contagem de coliformes fecais foi 280 NMP/g, portanto fora da legislação atual vigente, que estabelece, para alface, um máximo permitido de 200 NMP/g.

A importância da temperatura de armazenamento é reforçada pela contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Segundo Nguyen-the e Prunier (1989), existe uma clara relação entre a deterioração presente em saladas prontas e a contagem da bactéria pectinolítica *Pseudomonas marginalis*, a mais frequentemente isolada, após 10 dias de armazenamento a 10°C. Para os autores, é necessário pelo menos uma contagem de 10^8 UFC/g nas folhas frescas da chicória para causar deterioração das saladas prontas. Como o alface apresenta uma maior facilidade de deterioração, por ser mais tenro e resistir menos ao manuseio, o efeito da temperatura é bem maior.

Sugere-se, pelos resultados encontrados, que a implementação das boas práticas de higiene e sanificação, bem como o controle da qualidade da água de irrigação, do substrato utilizado na formação das mudas e da água de irrigação, são fundamentais para a obtenção de uma contagem inicial menor destas bactérias, retardando a deterioração do produto. Observou-se, a 10°C, uma quantidade elevada de bactérias desta espécie antes de atingir o sétimo dia, o que, a 2°C, só aconteceu após 14 dias. (Tabela 3).

Observou-se pouco crescimento das bactérias do gênero *Pseudomonas* até o terceiro dia para ambas as temperaturas de armazenamento e um crescimento bastante acentuado após este período, somente a 10°C.

4.11.2 Identificação das bactérias

A identificação das bactérias isoladas pode ser visualizada na Tabela 4.

A microbiota isolada e identificada está em concordância com os dados já reportados em literatura, por outros autores. Segundo King Jr. et al. (1991), as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Serratia* foram as espécies mais encontradas. Segundo Robbs et al. (1997), em vários isolamentos realizados em alfaces hidropônicas provenientes da região sudeste do Brasil, encontraram-se algumas espécies do gênero *Pseudomonas*, tais como *Pseudomonas fluorescens*, *P. cichorii* e *P. aeruginosa* e enterobactérias como *Erwinia carotovora* e *E. chrysanthemi*, todas pectinolíticas.

Neste experimento, também foram isoladas bactérias do gênero *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *Burkholderia cepacia* (= *Pseudomonas cepacia*), mas não foram encontradas bactérias do gênero *Erwinia*, o que está de acordo com o trabalho de Nguyen-the e Carlin (1994), que reportam o isolamento esporádico desta bactéria.

Segundo Cantwell (1992), a flora normal deteriorante, incluindo as bactérias do gênero *Erwinia* e *Pseudomonas*, geralmente tem uma vantagem competitiva, através da melhor utilização das fontes de carbono e nitrogênio, sobre outros microrganismos que podem ser potencialmente prejudiciais aos humanos.

TABELA 7. Microbiota isolada e identificada em anácase micropônico, cv. Regina, minimamente processado durante armazenamento, embalado em saco plástico termosoldado, e mantidos a temperatura de 2°C e de 10°C.

Temperatura (°C)	Tempo (dias)				
	0	3	7	10	14
Ambiente	<i>Burkholderia cepacia</i> ¹ <i>Escherichia hermannii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				
2		<i>Burkholderia cepacia</i> ¹ <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹	<i>Enterobacter cloacae</i> ¹ <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹ <i>Serratia fonticola</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Ewingella americana</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> ¹ <i>Hafnia alveii</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
10		<i>Escherichia hermannii</i> <i>Flavobacterium odoratum</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> ¹ <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> ¹ <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> ¹ <i>Serratia marcescens</i> (apigmentada) ¹ <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Aeromonas sobria</i> <i>Bacilos Gram Negativos</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

1- Patogênica à humanos e alface.

De acordo com Nguyen-the e Carlin (1994), a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* provavelmente não depende da contaminação externa, pois elas são tidas como residentes endógenos.

Da mesma maneira, foram isoladas bactérias do gênero *Klebsiella*, o que confirma os resultados de Wright, Kominos e Yee (1976), que reportaram a presença freqüente de altas contagens de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* em saladas de vegetais servidas para pacientes em hospitais. Os autores reportaram também que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada frequentemente, mas em contagens mais baixas.

Neste experimento, no décimo dia de armazenamento a 10°C, foram isoladas colônias da bactéria *Serratia marcescens*, pigmentadas e apigmentadas, sendo que através de testes bioquímicos, foi confirmada a sua presença com 99,95% de similaridade, confirmando o relato de Robbs et al. (1998), que reportam uma elevada presença de bactérias produtoras de pigmento avermelhado ou apigmentadas, com características de *Serratia spp.*, em amostras de alface cultivadas em hidroponia, procedentes de mercados nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Segundo este autor, esta espécie bacteriana é considerada um patógeno oportunista, podendo causar septicemia em pacientes estressados em ambiente hospitalar, ou como agente fitopatogênico.

Também foram encontrados neste experimento, microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli* e outras espécies, inclusive algumas hemolíticas, de *Serratia marcescens*. Os resultados obtidos estão em desacordo com Barriga et al. (1991), que utilizando alface cortado cv. "Great Lakes", observaram a população inicial de microrganismos e as suas mudanças sob diferentes atmosferas controladas. Os autores não encontraram microrganismos patogênicos aos humanos e concluíram que o controle da atmosfera tem um pequeno ou nenhum efeito sobre a população estudada.

Embora a atmosfera modificada possa mudar o perfil microbiano geral do alimento (Brackett, 1987b), estes efeitos têm sido pouco estudados (Barriga et al., 1991).

A concentração de CO₂ dentro da embalagem pode ter influenciado no comportamento da microbiota e na presença de algumas espécies patogênicas, principalmente a 10°C. Como exemplo, o isolamento de *E. coli*, no sétimo dia de armazenamento, quando o produto apresentava, dentro da embalagem, cerca de 5% de CO₂, e após o décimo dia, quando esta concentração era superior a 8%, este microrganismo não foi detectado. A ausência de *E. coli*, a partir do décimo dia, também pode ser devido a uma vantagem competitiva do crescimento da bactéria *Burkholderia cepacia*, tida como antagônica.

Para a temperatura de 2°C, esta hipótese é suportada por Maxcy (1978), mostrando que, em baixas temperaturas, a microbiota presente é principalmente constituída de bactérias Gram negativas e que, com o aumento da temperatura a flora muda para bactérias lácticas Gram positivas. O crescimento de bactérias ácido-láticas, presentes naturalmente no produto, pode ser um importante fator no crescimento de outras bactérias, com um efeito metabiótico, favorecendo o crescimento de outras espécies. Ainda segundo o autor, a produção de bacteriocinas pelas bactérias ácido-láticas poderá ser outro fator que contribui para a inibição da *A. hydrophila* e outros microrganismos patogênicos.

Os resultados obtidos por Maxcy (1978) são confirmados por Barriga et al. (1991), que observaram uma baixa contagem de bactérias ácido-láticas, podendo ser explicada pela competição com outras populações, como os microrganismos pectinolíticos, que apresentam uma maior taxa de crescimento a baixas temperaturas e são melhor adaptados para se desenvolver em alface.

Os resultados encontrados confirmam a presença de bactérias do gênero *Seromonas* no produto armazenado a 10°C, o que não ocorreu no produto armazenado a 2°C.

García-Gimeno et al. (1996), estudando o comportamento de *Aeromonas hydrophila* em saladas mistas de vegetais, afirmam que o declínio do crescimento deste microrganismo foi devido aos baixos valores do pH observados paralelamente aos altos níveis de CO₂. Um maior aumento do número de bactérias ácido-láticas, associado ao efeito da alta concentração de CO₂, foi provavelmente responsável pela diminuição do pH. Segundo os autores *Aeromonas hydrophila* sobrevive, mas não cresce em vegetais armazenados sob atmosfera modificada a 4°C.

A presença da bactéria oportunista *Stenotrophomonas maltophilia* (sinônimo de *Pseudomonas maltophilia* e de *Xanthomonas maltophilia*), que apresenta uma ampla distribuição geográfica, foi detectada através dos testes bioquímicos, com uma similaridade de 98,03%. Testes preliminares detectaram a presença desta bactéria, isolada em amostras de raízes de alface hidropônicos. Esta bactéria está associada com infecções respiratórias, no trato urinário, septicemias e linfomas.

Neste experimento, no armazenamento a 10°C, a partir do 3º dia observou-se uma queda significativa na qualidade do produto, envolvendo os seus principais atributos, como uma perda acentuada da cor, do frescor, da impressão geral da aparência e a percepção ou o aparecimento de características indesejáveis, tais como o escurecimento da nervura central, das bordas, além de coincidir com um aumento acentuado na contagem de coliformes totais, fecais e na contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Ao atingir o 7º dia de armazenamento, o produto encontrou-se fora da legislação vigente, para coliformes fecais.

Segundo Couture, Cantwell e Saltveit (1993), nenhum atributo testado no primeiro dia do experimento pode ser usado para prever a vida útil e a qualidade final do alface minimamente processado.

Em geral, as áreas descoloridas estão localizadas nas bordas ou nas pontas dos pedaços do alface que apresentavam defeitos físicos devido a problemas de amassamento ou atrito. Segundo King Jr. et al. (1991), a avaliação de pedaços de alface mostrou que estes não são visualmente afetados pelo crescimento microbiano.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com Nguyen-the e Prunier (1989), que constatam que a deterioração de saladas prontas para o consumo está ligada às margens e à nervura central das folhas e pode ser causada por vários fatores, incluindo ataques microbiológicos, oxidações bioquímicas de fenóis ou fitotoxicidade do CO₂. Segundo os autores, o aparecimento de pequenas necroses e manchas rosas e marrons que aparecem nas margens, nos cortes e nas nervuras centrais das folhas, com poucos dias de armazenamento a 10°C, é a principal causa da deterioração nas saladas prontas para consumo, sendo difícil explicar sua origem e reduzir sua incidência. Os mesmos autores afirmam que existe uma clara relação entre a deterioração existente em saladas prontas e a contagem da bactéria *Pseudomonas marginalis*, a mais frequentemente isolada, após 10 dias de armazenamento a 10°C.

Com base nos resultados das análises dos isolados das bactérias, fica evidente que os gêneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Enterobacter* predominam na microbiota do alface hidropônico fresco, cortado e armazenado em embalagens plásticas seladas, porém outras bactérias oportunistas também podem ocorrer.

O isolamento e a identificação de bactérias patogênicas, principalmente nos produtos armazenados a 10°C, demonstram que mesmo com todos os cuidados utilizados e necessários na preparação do produto, estes poderão ser insuficientes se não mantivermos o controle da temperatura de armazenamento próximo a 2°C, reduzindo o crescimento de patógenos psicrófilos oportunistas.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nas condições experimentais do presente trabalho, conclui-se que:

- Para ambas temperaturas de armazenamento (2 e 10°C), não houve nenhum comprometimento do produto com qualquer um dos aspectos de qualidade analisados, até o terceiro dia.

- O alface hidropônico minimamente processado, armazenado a 2°C apresentou uma vida útil de 7 dias, sem comprometer suas principais características físicas, físico-químicas, químicas, bioquímicas e sensoriais, além de reduzir o crescimento de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes.

- Para o produto armazenado a 10°C, a vida útil é de no máximo 3 dias devido, principalmente, ao comportamento do pH, ao efeito do CO₂, à degradação da clorofila e ao aumento acentuado na atividade das enzimas PFO e da FAL, que estão fortemente associadas às mudanças nos atributos sensoriais do produto

- A temperatura de armazenamento de 10°C permitiu, após sete dias, o crescimento de bactérias psicotróficas patogênicas, as quais, em níveis mais elevados, podem ser prejudiciais à saúde humana.

- As práticas utilizadas de higiene e sanificação reduziram, mas não foram suficientes, para eliminar todas as bactérias deteriorantes/patogênicas presentes, endógenas e/ou exógenas ao produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E. Ethylene in plant biology. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1992.
- ADAMS, M.R.; HARTLEY, A.D.; COX, L.J. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. **Food Microbiology**, London, v.6, p.69-77, 1989.
- ALLIEN, J.W.; PIERSON, T.R. Fresh prepared foods: marketing opportunities and challenges for rapid growth. Michigan: **Food Industry State Institute**, 1988.
- ANDERSON, R.E. Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, p.647-649, 1984.
- BALLANTYNE, A.; STARK, R.; SELMAN, J.D. Modified atmosphere packaging of broccoli florets. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.23, p.353-360, 1988a.
- BALLANTYNE, A.; STARK, R.; SELMAN, J.D. Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.23, p.267-274, 1988b.
- BARMORE, C.R. Packaging technology for fresh and minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Westport, v.10, n.3, p.207-217, 1987.
- BARRIGA, M.I.; TRACHY, G.; WILLEMOT, C.; SIMARD, R.E. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, p.1586-1588, 1991.
- BENNIK, M.H.J.; PEPPELENBOS, H.W.; NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, p.209-221, 1996.
- BERNARDES, L.J.L. A produção de vegetais no sistema de cultivo sem solo. Piracicaba, Hidropomarias & Cia., n.2. 1996.

- BERRANG, M.E.; BRACKETT, R.E.; BEUCHAT, L.R. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled-atmosphere. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, p.702-705, 1989.
- BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, p.755-758, 1990.
- BOLIN, H.R.; HUXSOLL, C.C. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.1, p.60-62,67, 1991.
- BOLIN, H.R.; STAFFORD, A.E.; KING JR., A.D. and HUXSOLL, C.C. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, p.1319-1321, 1977.
- BOWER, J.P.; VAN LELYVELD, L.J. The effects of stress history and container ventilation on avocado fruits polyphenol oxidases activity. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.60, p.545-547, 1985.
- BROWN, A.W. CO₂ and intracellular pH. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.8, p.459-465, 1985.
- BRACKETT, R.E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Amex, v.50, p.999-1003, 1987a.
- BRACKETT, R.E. Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Wesport, v.10, n.3, p.195-206, 1987b.
- BRACKETT, R.E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, p.808-814, 1992.
- BRACKETT, R.E.; SUNDLEWOOD, D.M.; FLETCHER, S.M.; HORTON, D.I. Food safety: Critical points within the production and distribution system. p.301-326. In: SHEWFELT, R.L. & PRUSSIA, S.E. (eds.). **Postharvest handling: A systems approach**. Academic, San Diego: Academic Press, 1993. p.301-302

- BRECHT, J.K. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.1, p.18-22, 1995.
- BRECHT, J.K. Use of controlled atmospheres to retard deterioration of products. **Food Technology**, Chicago, v.34, n.3, p.45, 1980.
- BROCKLEHURST, T.F.; ZAMAN-WONG, C.M.; LUND, B.M. A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v.63, p.409, 1987.
- BRUINSMA, J. The quantitative analysis of chlorophylls A and B in plant extracts. **Photochemistry and Photobiology**, Elmsford, v.2, p.241-249, 1963.
- BURNS, J.K. Lightly processed fruits and vegetables: introduction to the colloquium. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.1, p.14, 1995.
- CAMERON, A.C.; PATTERSON, B.D.; TALASILA, P.C.; JOLES, D.W. Modeling the risk in modified-atmosphere packaging: A case for sense and respond packaging. In: INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE, 5., 1993, Ithaca, NY. **Proceedings...** Ithaca, NY, 1993. P. 95-102. p.95-102. In: Blanpied, G.D.; Bartsch, J.A. & Hicks, J.R. (eds.). Proc. Sixth Intl. Controlled Atmosphere Res. Conf. v.1, p.15-17. June 1993. Ithaca, N.Y. 1993.
- CAMERON, A.C.; TALASILA, P.C.; JOLES, D.W. Predicting film permeability needs for modified-atmosphere packaging of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.1, p.25-34, 1995.
- CANTWELL, M. Fresh-cut product biology requirements. **Perishables Handling Newsletter**, University of California, v.81, p.4-6, 1995.
- CANTWELL, M. Postharvest handling systems. Minimally processed fruits and vegetables. p.277-281. In: KADER A.A. (ed). **Postharvest technology of horticultural crops**. 2.ed. Davis: Univ. of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 1992. p.277-281.
- CASTELLANE, P.D.; ARAÚJO, J.A.C. **Cultivo em solo - hidroponia**. Jaboticabal: FUNESP/UNESP, 1994. 43p.
- CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras, UFLA/FAEPE, 1990. 320p.

- CLARK, D.S.; TAKACS, J. Gases as preservatives. In SILLIKER, J.H., ELLIOTT, R.P., BAIRD-PARKER, A.C., BRYAN, F.L., CHRISTIAN, J.H.B., CLARK, D.S., OLSON, J.C.; ROBERTS, T.A. (eds.) **Microbial Ecology of Foods**, New York: Academic Press, 1980.v. 1, p.170-192.
- HOOK, R. The U.S. food industry: some keys trends and marketing strategies. **Perishables Handling Newsletter**,. University of California, v.89, p.2-5, 1997.
- ORLETT, D.A., Jr. Refrigerated foods and use of hazard analysis and critical control point principles. **Food Technology**, Chicago, v.43, p.91-94, 1989.
- OUTURE, R.; CANTWELL, M.I.; KE, D.; SALTVEIT, M.E. Physiological attributes related to quality attributes and storage of minimally processed lettuce. **HortScience**, Alexandria, v.28, p.723-725, 1993.
- ROTHERS, D. Packaging technology extends reach of precuts. **Produce business**, Boca Raton, Aug., p.33, 1992.
- AVIS, H.; TAYLOR, J.P.; PERDUE, J.N.; STELMA, JR. G.N.; HUMPHREYS, JR. J.M.; ROWNTREE, III, R.; GREENE, K.D. A shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.128, p.1312-1321, 1988.
- NGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.3, n.1, p.39-45, 1991.
- ZELL, B.D.; WILCOX, M.S. Loss of carotene in fresh vegetables as related to wilting and temperature. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, Washington, v.10, p.124-126, 1962.
- ZELL, B.D.; WILCOX, M.S. Loss of vitamin C in fresh vegetables as related to wilting and temperature. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, Washington, v.7, p.507-509, 1959.
- AQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; VILELA, L.A.A. **Produção de alface em hidroponia**. Lavras: UFLA. Departamento de Ciência do Solo, 1996. 50p.

- FRIEDMAN, B.A. Vacuum cooling of prepackaged spinach, coleslaw and mixed salad. *Resumos. American Society for Horticultural Science Alexandria*, v.58, p.279, 1951.
- GALLIARD, T. The enzymic degradation of membrane lipids in higher plants. In: APPELQUIST, L.A.; LILJENBERG, C. (eds.) *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plants Lipids*. Elsevier, Biomedical Press, 1979.p.121.
- GARCÍA-GIMENO, R.M.; SANCHEZ-POZO, M.D.; AMARO-LÓPEZ, M.A.; ZURERA-COSANO, G. Behavior of *Aeromonas hydrophila* in vegetable salads stored under modified atmosphere at 4 and 15°C. *Food Microbiology*, London, v.13, p.369-374, 1996.
- GARG, N.; CHUREY, J.J.; SPLITTSTOESSER, D.F. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, Ames, v.53, n.8, p.701-703, 1990.
- GAYNOR, M. The 1990's: Waving in a fresh decade. *Food Bus.*, Jan. v.23, p.34, 1989.
- GIBBS, P.A.; DAVIES, A.R.; FLETCHER, R.S. Incidence and growth of psychrotrophic *Clostridium botulinum* in foods. *Food Control*, Oxford, v.5, n.1, p.5-7, 1994.
- GORNY, J.R. Modified atmosphere packaging and the fresh-cut revolution. *Perishables Handling Newsletter*, University Californy, v.90, p.4-5, 1997.
- GORRIS, L.G.M.; BENNIK, M.H.J. Improvement of the safety and quality of refrigerated ready-to-eat foods using novel mild preservation techniques: bioconservation as a safety hurdle. In: CONGRESS IIR/IF 19th., 1995, The Hague. *Proceedings ... The Hague 1995*. p.392-398.
- GRAZIANO, J. Fresh-cut at a glance. *Produce Business*, Boca Roton, v.9, n.10, p.42-48, 1993.
- HANSCHKE, P.E. and BOYNTON, B. Heritability of enzymatic browning in peaches. *HortScience*, Alexandria, v.21, p.1195-1197, 1986.

- HANSON, K.R.; HAVIR, E.A. An introduction to the enzymology of phenylpropanoid biosynthesis. In: SWAIN, T.; HARBONE, J.B. & SUMERE, C.F (eds.) **The biochemistry of Plant Phenolics**, New York, Plenum Press 1979. p. 91-138.
- HEIMDAL, H.; KUHN, B.F.; POLL, L.; LARSEN, L.N. Biochemical changes and sensory quality of shredded on MA packaged iceberg lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.6, p.1265-1277, 1995.
- HERNER, R.H.; KRAHN, T.R. **Chopped lettuce should be kept dry and cold.** Yearbook Prod. Mark. Assoc. p.130, 1973.
- HINTLIAN, C.B.; HOTCHKISS, J.H. The safety of modified atmosphere packaging: A review. **Food Technology**, Chicago, v.40, p.70-76, 1986.
- HOBSON, G.E.; TUCKER, W.G. Lightly-processed horticultural products. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, p.113-114, 1996.
- HODGE, K. Fresh-cut and the "Perfect Meal". **Fresh-cut**, Yakima, WA, v.3, n.8, p.12, 14, 20, 1995.
- HUGH, R.; LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.66, p.24-26, 1953.
- HURST, W.C. (ed.). Recommended sanitary guidelines for produce processing industry. **National Association Fresh Produce Processors**, Alexandria, 1992.
- HURST, W.C. Sanitation of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.1, p.22-24, 1995.
- HUXSOLL, C.C.; BOLIN, H.R. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.43, p.124-128, 1989.
- HYODO, H.O.; KURODA, H.; YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**. Rockville, v.62, p.31-35, 1978.

- JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**. Elmsford, v.23, p.1349-1359, 1984.
- JONES, M. Modified atmospheres. In: Gould, G.W. (ed.) **Mechanisms of action of food preservation procedures**. Cap.10. London: Elsevier Applied Science, 1989.
- JORNAL DO BRASIL, em 21/06/97- 1º Caderno - p.17.
- KADER, A.A. Prevention of ripening in fruits by use of controlled atmospheres. **Food Technology**, Chicago, v.34, n.3, p.51, 1980.
- KADER, A.A.; ZAGORY, D.; KERBEL, E.L. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. **CRC Critical Review Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.28, p.1-30, 1989.
- KAHN, V. Latency properties of polyphenoloxidase in two avocado cultivars differing in their rates of browning. **Journal of Science Food and Agriculture**, Oxford, v.28, p.233-239, 1977.
- KE, D.; SALTVEIT, M.E. Carbon dioxide-induced brown stain development as related to phenolic metabolism in iceberg lettuce. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, p. 789-794, 1989b.
- KE, D.; SALTVEIT, M.E. Developmental control of russet spotting, phenolic enzymes, and IAA oxidase in cultivars of iceberg lettuce. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.3, p.472-477, 1989d.
- KE, D.; SALTVEIT, M.E. Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. **Plant Physiology**. Rockville, v.88, p.1136-1140, 1988.
- KE, D.; SALTVEIT, M.E. Regulation of russet spotting, phenolic metabolism and IAA oxidase by low oxygen in iceberg lettuce. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.114, p.638-642, 1989a.
- KE, D.; SALTVEIT, M.E. Wound induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. **Plant Physiology**, Rockville, v.76, p. 412-418, 1989c.

- ERR, K.G.; BIRKENHEAD, D.; SEALE, K.; MAJOR, J.; HANKEY, P.M. Prevalence of *Listeria spp.* on the hands of food workers. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, p.525-527, 1993.
- ING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v.44, p.301-307, 1954.
- ING, JR., A.D.; BOLIN, H.R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. **Food of Technology**, Chicago, v.43, p.132-139, 1989.
- ING JR., A.D.; MAGNUSON, J.A.; TOROK, T.; GOODMAN, N. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.2, p.459-461, 1991.
- LEIN, B.P. Nutritional consequences of minimal processing of fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Westport v.10, n.3, p.179-193, 1987.
- RAHN, T.R. Improving the keeping quality of cut head lettuce. **Acta Horticultural**, Wageningen, v.62, p.79-92, 1977.
- ATIES, G.G. The development and control of respiratory pathways in slices of plant storage organs. In: KAHL, G. (ed.). **Biochemistry of wounded tissues**. Berlin: Walter de Gruyter & Company, 1978. p.421-466.
- AURILA, E.; KERVINEM, R.; AHVENAINEN, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Postharvest News and Information**, Wallingford, v.9, n.4, p.53-66, 1998.
- LAO, C.H.; WELLS, J.M. Diversity of pectolytic fluorescent pseudomonads causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.673-677, 1987.
- IPTON, W.J. Carbon dioxide-induced injury of romaine lettuce stored in controlled atmosphere. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.3, p.461-462, 1997.
- ITTLEFIELD, N.A. **Physiochemical and toxicological studies on controlled atmosphere storage of certain deciduous fruits**. Logan: Utah State University, 1968.

- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; SALTVEIT, M.; CANTWELL, M. The visual quality of minimally processed lettuces stored in air or controlled atmosphere with emphasis on romaine air iceberg types. **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v.8, p.179-190, 1996a.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; SALTVEIT, M.; CANTWELL, M. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: Factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v.9, p.223-233, 1996b.
- LYONS, J.M. Chilling injury in plant. **Annual Review of Plant Physiology** Palo Alto, v.24, p.445-466, 1973.
- MacFIE, H.J.H.; BRATCHELL, N.; GRENHOFF, K.; VALLIS, L.V. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effect in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, Trumbull, CT, v.4, p.129-148 1989.
- MACHADO, A.A.; ZONTA, E.P. **Manual do Sanest - Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPel, 1991. 102 p.
- MAGNUSON, J.A.; KING, JR.,A.D.; TÖRÖK, T. Microflora of partially processed lettuce. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, n.12 p.3851-3854, 1990.
- MANVELL, P.M.; ACKLAND, M.R. Rapid detection of microbial growth in vegetable salads at chill and abuse temperatures. **Food Microbiology** London, v.3, p.59-65, 1986.
- MATEOS, M.; KE, D.; CANTWELL, M.; KADER, A. A. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO₂-enriched atmospheres. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.3 p.225-233, 1993a.
- MATEOS, M.; KE, D.; KADER, A.; CANTWELL, M. Differential response of intact and minimally processed lettuce to high carbon dioxide atmospheres. **Acta Horticultural**, v.343, p.171-174, 1993b.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Tóquio, v.13, p. 1091-1101, 1972.

- MAXCY, R.B. Fate of microbial contaminants in lettuce juice. **JOURNAL OF Food Protection**, Ames, v.45, p.335, 1982.
- MAXCY, R.B. Lettuce salad as a carrier of microorganisms of public health significance. **journal of Food Protection**, Ames, v.41, p.435, 1978.
- MAZLIAK, P. Plant membrane lipids: Changes and alterations during aging and senescence. In: LIEBERMAN, M. (ed.) **Postharvest Physiology and Crop Preservation**. New York: Plenum Press 1983. p.123.
- MAZOLIER, J.; BARDET, M.C.; BONNAFOUX, F. La laitue en IV^e gamme. **Infos-Ctifl**, v.59, p.23-26, 1990.
- McDONALD, R.E.; RISSE, L.A.; BARMORE, C.R. Bagging chopped lettuce in selected permeability films. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.6, p.671-673, 1990.
- McEVILY, A.J.; IYENGAR, R.; OTWELL, W.S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Reviews Food Science Nutrition**. Boca Raton, v.32, p.253-273, 1992.
- MUNDT, J.O.; NORMAN, J.M. Metabiosis and pH of moldy fresh tomatos. **Journal Food Protection**, Ames, v.45, p.829-832, 1982.
- MURR, D.P.; MORRIS, L.L. Influence of O₂ and CO₂ on *o*-diphenol oxidase activity in mushrooms. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.99, p.155-158, 1974.
- NEELIMA, G.; CHIVEY, J.J.; SPLITTSTOESSER, D.F. Effect of processing conditions on the mucoflora of fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection**, Ames, v.534, p.701-703, 1990.
- NGUYEN-the, C; CARLIN, F. The microbiology of minimally-processed fresh fruits and vegetables. **CRC Critical Review Food Science Nutrition**, Boca Raton, v.34, n.4, p.371-401, 1994.
- NGUYEN-the,C.; PRUNIER, J.P. Involvement of pseudomonads in deterioration of "ready-to-use" salads. **International Journal of Food Science Technology**, Oxford, v.24, p.47-58, 1989.

- NICOLAS, J.J.; RICHARD-FORGET, F.C.; GOUPY, P.M.; AMIOT, M.J. AUBERT, S.Y. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, Boca Raton, v.34, n.2 p.109-157, 1994.
- O'BEIME, D. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. In GORMLEY, T.R. (ed.). **Chilled foods**. New York: The state of the art Elsevier Science Company, 1990. p. 183-199.
- PEISER, G.; LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; CANTWELL, M.; SALTVEIT, M. E. Phenylalanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.14, p.171-177, 1998
- PETHER, J.V.S.; GILBERT, R.J. The survival of salmonellas on finger-tips and transfer of organisms to foods. **Journal of Hygiene Camb. Prague**, V.69 p.673-681, 1971.
- PRIEPKE, P.E.; WEI, L.S.; NELSON, A.I. Refrigerated storage of prepackaged salad vegetables. **Journal of Food Science**, Chicago, v.41, p.379, 1976.
- RESURRECCION, A.V.A.; PRUSSIA, S.E. Food related attitudes: Differences between employed and non-employed women. In: ANNUAL CONFERENCE ON AMERICAN COUNCIL ON CONSUMER INTEREST, 32., 1986, Columbia, MO. **Proceeding...** Columbia American Council on Consumer Interests, 1986. p. 156.
- RHODES, M.J.C.; WOOLTORTON, L.S.C. The effect of ethylene on the respiration and on the activity of phenylalanine ammonia lyase in swede and parship root tissue. **Phytochemistry**, Oxford, v. 10, p.1989-1997, 1971.
- RITENOUR, M.A.; AHRENS, M.J.; SALTVEIT, M.E. Effects of temperature on ethylene-induced phenylalanine ammonia lyase activity and russet spotting in harvested Iceberg lettuce. **Journal American Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.1, p.84-87, 1995.
- ROBBS, C.F. Bactérias de importância em clínica hospitalar patogênicas à hortifrutícola em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.23, n.1, p.95, 1997.

- ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; ALMEIDA, I.M.G.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN. P.M. Bactérias patogênicas à alface produzida em hidroponia na região sudeste do Brasil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.23, n.1, p.70, 1997.
- ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; ALMEIDA, I.M.G.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN. P.M. *Pantoea agglomerans*, causando podridões de alface em culturas hidropônicas. **Summa Phytopathologica**, São paulo, v.24, n.1, p.80, 1998.
- ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; CENCI, S.A.; ANDERSEN. P.M. Variabilidade em *Serratia marcescens*, um patógeno oportunista. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.24, n.1, p.80,1998.
- ROLLE, R.S.; CHISM, III, G.W. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Westport, v.10, n.3, p.157-177,1987.
- ROMIG, W.R. Selection of cultivars for lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.1, p.38-40, 1995.
- ROOK, R.J.; CARSON, K.L.; THOMPSON, P. Processing, packaging, and regulation of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.43, p.136-139, 1989.
- RODDIK, M.F.; EL-SHERBEENY, M.R.; BRYAM, F.L. Microbiological profiles of Egyptian raw vegetables and salads. **Journal of Food Protection**, Ames, v.48, p.883, 1985.
- ROLDVEIT, M.E.; KE, B. Carbon dioxide-induced brown stain developments as related to phenolic metabolism in iceberg lettuce. **Journal of American Society. for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.5, p.789-794, 1989.
- ROHLIMME, D.V. Marketing lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.1, p.15-17, 1995.
- ROTT, V.N. Implementation of HACCP in a food processing plant, **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, p.548-554, 1993.

- SEGAL, M.I.; SCANTON, M.G. Design and analysis of modified-atmosphere package for minimally processed romaine lettuce. . **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.121, n.4, p.722-729, 1996
- SHAW, M.; BOLWELL, G.P.; SMITH, C. Wound-induced phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs: significance of glycosylation and immunolocalization of enzyme subunits. **Biochemical Journal**, Essex, v.267, p.163-170, 1990.
- SHEWFELT, R.L. Measuring quality and maturity. In: SHEWFELT, R.L. & PRUSSIA, S.E. (eds.). **Postharvest handling: A systems approach**. New York: Academic Press, 1993. p.100-125.
- SHEWFELT, R.L. Quality of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Westport, v.10, n.3, p.143-156, 1987.
- SINELL, H.J. Packaging. Ch. 11. In: Silliker, J.H.; Elliot, R.P.; Baird-Parker A.C.; Bryan, F.L.; Christian, J.H.B.; Clark, D.S.; Olson Jr., J.C. and Roberts T.A. (Ed.), **Microbial Ecology of Foods**. New York: Academic Press 1980. v. I, Cap.II, p.193.
- SINGH, B.; WANG, J.; SALUNKHE, D.K. Controlled atmosphere storage of lettuce., 2. Effects on biochemical composition of the leaves. **Journal of Food Science**, Chicago, v.37, p.52-55, 1972.
- SIRIPHANIC, J.; KADER, A.A. Effects of CO₂ on total phenolics, phenylalanine ammonia lyase and polyphenoloxidase in lettuce tissue. . **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.110, p.249-253 1985.
- SIRIPHANICH, J.; KADER, A.A. Changes in cytoplasmic and vacuolar pH in harvested lettuce tissue as influenced by CO₂. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.111, p.73-77, 1986.
- SPECK, M.L. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** Washington, DC: American Public Health Association, 1984. p.62.
- TANAKA, M.A. Fitossanidade. Encontro de Hidroponia, 1, Campinas, UNICAMP, 6p. (Apostila). 1995.

- FEISSON, C. Le brunissement interne de l'ananas. I- Historique. II- Material et méthodes. **Fruits**, Paris, v.34, n.4, p.245-281, Apr. 1979.
- TORRIANI, S.; MASSA, S. Bacteriological survey on red-uses sliced carrots. **Lebensmittel-wissenschaft und -technologie**, v.27, p.487-490, 1994.
- VAROQUAX, P.; MAZOLLIER, J.; ALBAGNAC, G. The influence of raw material characteristics on storage life of fresh-cut butterhead lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, p.127-139, 1996.
- WATADA, A.E.; ABE, K.; YAMAUCHI, N. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.44, n.5, p.116,118,120-122, 1990.
- WATADA, A.E.; KO, N.P.; MINOTT, D.A. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, p.115-125, 1996.
- WHITAKER, J.R.& LEE, C.Y. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In: LEE, C.Y.; WHITAKER, J.R. (eds) **Enzymatic browning and its prevention**. Washington, DC, USA; 1995. p.2-7. (ACS Symposium Series 600).
- WILEY, R.C. (Ed.) **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**. New York: Chapman & Hall, 1994. p.1-15.
- WILLS, R.B.H.; MCGLASSOM, W.B.; GRAHAM, D.; LEE, T.H.; HALL, E.G. **Postharvest, an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables**. 3 ed. New York: Van Nostrand Reinhold., 1989.
- WRIGHT, C.; KOMINOS, S.D.; YEE, R.B. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetables salads. **Applied Environmental Microbiology**, v.31, n.3, p.453-454, 1976.
- YAMAUCHI, N.; WATADA, A.E. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. **Journal of American Society Horticultural Science**, v.116, p.58-62. 1991.
- YANO, T.; KOJIMA, I.; TORIKATA, Y. In: Water activity: influences on food quality. In: ROCKLAND, L.B.; STEWART, G.F. (eds.). **Role of water in withering of leafy vegetables**. New York: Academic Press, 1981. p. 765-780.

- ZAGORY, D. Proposta para o PROCISUR, Workshop sobre alimentos minimamente processados, EMBRAPA-CTAA, outubro de 1997.
- ZEPPLIN, M.; ELVEHJEM, C.A. Effects of refrigeration on retention of ascorbic acid in vegetables. **Food Research**, Palo Alto, v.9, p.100-111, 1944.
- ZHOU, Y.F.; ABE, K.; IWATA, T. Effect of shredding modes on the deterioration of the quality of partially processed pepper fruits. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Lbaraki, Japan, v.39, p.161-166, 1992.
- ZIND, T. Age of pre-cut \$4-8B market seen by 2000. **The Packer**, Chicago, 2 April, p.1A 1990.
- ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Baltimore, v.40, n.5, p.779-784, Sept. 1965.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
A1	111
Resumo da análise de variância da acidez, clorofila, CO ₂ , Fenilalanina amônia-liase(FAL), pH e polifenol oxidase (PFO).....	
A2	112
Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas dentro da temperatura 2°C	
A3	113
Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas dentro da temperatura 10°C	
A4	114
Resumo da análise de variância da cor, frescor, escurecimento da nervura central (ENC), escurecimento das bordas (EB), cozido (COZ), podre e impressão geral da aparência (IGA)	
A5	115
Correlação de Pearson entre as variáveis sensoriais dentro da temperatura 2°C	
A6	116
Correlação de Pearson entre as variáveis sensoriais dentro da temperatura 10°C	
A7	117
Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, químicas (acidez, clorofila e CO ₂) e sensoriais dentro da temperatura 2°C	
A8	118
Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, bioquímicas (FAL, pH e PFO) e sensoriais dentro da temperatura 2°C	
A9	119
Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, químicas (acidez, clorofila e CO ₂) e sensoriais dentro da temperatura 10°C	
A10	120
Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, bioquímicas (FAL, pH e PFO) e sensoriais dentro da temperatura 10°C	

TABELA A1. Resumo da análise de variância da acidez, clorofila, CO₂, Fenilalanina amônia-liase (FAL), pH e polifenol oxidase (PFO).

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios					
		Acidez	pH	CO ₂	Clorofila	PFO	FAL
Temperatura	1	0,0000ns	0,09075*	33,53438**	788,48133**	10734,45168**	0,42150**
Tempo de armazenamento	4	0,00105**	0,14940**	57,08664**	4256,03187**	14097,67890**	1,40723**
Temperatura*Tempo	4	0,00002ns	0,11812**	3,83185**	1101,92904**	7116,12251**	0,04159**
Resíduo	20	0,00011	0,01770	0,06327	37,09133	3,56325	0,00486
Média geral		0,11	5,96	5,22	169,27	52,03	1,04
Coef. Variação (%)		9,36	2,23	4,82	3,60	3,63	6,68

n.s., *, **, não significativo e respectivamente significativo aos níveis de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA A2. Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas e bioquímicas dentro da temperatura 2°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
Acidez	Clorofila	15	-0,6340	0,0056**
Acidez	CO ₂	15	0,6539	0,0041**
Acidez	FAL	15	0,5409	0,0187*
Acidez	pH	15	-0,1972	0,2406NS
Acidez	PFO	15	0,4031	0,0681NS
Clorofila	CO ₂	15	-0,9562	0,0000**
Clorofila	FAL	15	-0,9456	0,0000**
Clorofila	pH	15	0,1351	0,3156NS
Clorofila	PFO	15	-0,8784	0,0000**
CO ₂	FAL	15	0,9314	0,0000**
CO ₂	pH	15	-0,1560	0,2894NS
CO ₂	PFO	15	0,8097	0,0001**
FAL	pH	15	0,0130	0,4817NS
FAL	PFO	15	0,9392	0,0000**
pH	PFO	15	0,1165	0,3397NS

NS, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

FAL - Fenilalanina amônia liase

PFO - Polifenoloxidase

TABELA A3. Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, químicas e bioquímicas dentro da temperatura 10°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
Acidez	Clorofila	15	-0,6001	0,0090**
Acidez	CO ₂	15	0,5421	0,0184*
Acidez	FAL	15	0,3950	0,0725NS
Acidez	pH	15	-0,2016	0,2356NS
Acidez	PFO	15	0,0185	0,4739NS
Clorofila	CO ₂	15	-0,5807	0,0116*
Clorofila	FAL	15	-0,3556	0,0967NS
Clorofila	pH	15	0,2888	0,1483NS
Clorofila	PFO	15	0,1576	0,2874NS
CO ₂	FAL	15	0,9476	0,0000**
CO ₂	pH	15	0,4973	0,0296*
CO ₂	PFO	15	0,6799	0,0026**
AL	pH	15	0,6365	0,0054**
AL	PFO	15	0,8440	0,0000**
H	PFO	15	0,8521	0,0000**

NS, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

AL- Fenilalanina amônia liase

FO - Polifenoloxidase

TABELA A4. Resumo da análise de variância da cor, frescor, escurecimento da nervura central (ENC), escurecimento das bordas (EB), cozido (COZ), podre e impressão geral da aparência (IGA).

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios						
		Cor	Frescor	ENC	EB	COZ	Podre	IGA
Provedores	12	1,99435**	2,43554*	2,20351*	2,02542*	3,84649*	0,45807ns	1,68748*
Tempo de armazenamento	4	86,79512**	153,10631**	159,90822**	119,87453**	110,65180**	111,90870**	138,40355**
Temperatura	1	147,51831**	202,50100**	166,56298**	233,70127**	128,65307**	395,08000**	230,65779**
Tempo*Temperatura	4	62,01192**	36,27162**	47,69905**	39,14431**	36,42965**	103,98244**	29,90870**
Resíduo	118	0,50645	1,12371	0,96452	1,44199	1,66895	0,67160	0,87958
Média geral		7,59	6,40	2,11	2,00	2,28	1,73	6,15
Coef. Variação (%)		9,37	16,57	46,57	60,06	56,77	47,47	15,25

n.s., *, **, não significativo e respectivamente significativo aos níveis de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA A5. Correlação de Pearson entre as variáveis sensoriais dentro da temperatura 2°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
COR	FR	5	0,9304	0,0109*
COR	ENC	5	-0,9283	0,0114*
COR	EB	5	-0,8542	0,0327*
COR	CO	5	-0,8976	0,0194*
COR	PO	5	-0,7362	0,0780NS
COR	IGA	5	0,9326	0,0104*
FR	ENC	5	-0,9999	0,0000**
FR	EB	5	-0,9849	0,0011**
FR	CO	5	-0,9825	0,0014**
FR	PO	5	-0,9065	0,0169*
FR	IGA	5	0,9982	0,0000**
ENC	EB	5	0,9853	0,0011**
ENC	CO	5	0,9799	0,0017**
ENC	PO	5	0,9045	0,0175*
ENC	IGA	5	-0,9971	0,0000**
EB	CO	5	0,9781	0,0019**
EB	PO	5	0,9419	0,0083**
EB	IGA	5	-0,9821	0,0014**
CO	PO	5	0,9521	0,0062**
CO	IGA	5	-0,9909	0,0000**
PO	IGA	5	-0,9180	0,0139*

NS, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

COR - Cor

FR - Frescor

ENC - Escurecimento da nervura central

EB - Escurecimento das bordas

CO - Cozido

PO - Podre

IGA - Impressão global da aparência

TABELA A6. Correlação de Pearson entre as variáveis sensoriais dentro () temperatura 10°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
COR	FR	5	0,8653	0,0291*
COR	ENC	5	-0,9574	0,0052**
COR	EB	5	-0,9397	0,0088**
COR	CO	5	-0,9796	0,0017**
COR	PO	5	-0,9348	0,0099**
COR	IGA	5	0,8582	0,0314*
FR	ENC	5	-0,9572	0,0053**
FR	EB	5	-0,9835	0,0013**
FR	CO	5	-0,9388	0,0090**
FR	PO	5	-0,9834	0,0013**
FR	IGA	5	0,9920	0,0000**
ENC	EB	5	0,9869	0,0009**
ENC	CO	5	0,9953	0,0000**
ENC	PO	5	0,9889	0,0007**
ENC	IGA	5	-0,9347	0,0099**
EB	CO	5	0,9813	0,0015**
EB	PO	5	0,9945	0,0000**
EB	IGA	5	-0,9778	0,0020**
CO	PO	5	0,9835	0,0013**
CO	IGA	5	-0,9206	0,0133*
PO	IGA	5	-0,9683	0,0034*

NS, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

COR - Cor

FR - Frescor

ENC - Escurecimento da nervura central

EB - Escurecimento das bordas

CO - Cozido

PO - Podre

IGA - Impressão global da aparência

ABELA A7. Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, químicas (acidez, clorofila e CO₂) e sensoriais dentro da temperatura 2°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
Acidez	COR	5	-0,3298	0,2939NS
Acidez	FR	5	-0,2688	0,3310NS
Acidez	ENC	5	0,2821	0,3228 NS
Acidez	EB	5	0,2099	0,3674 NS
Acidez	CO	5	0,0860	0,4453 NS
Acidez	PO	5	-0,0528	0,4664 NS
Acidez	IGA	5	-0,2158	0,3637 NS
Clorofila	COR	5	0,7825	0,0589*
Clorofila	FR	5	0,7776	0,0608*
Clorofila	ENC	5	-0,7861	0,0574*
Clorofila	EB	5	-0,7251	0,0829NS
Clorofila	CO	5	-0,6497	0,1177NS
Clorofila	PO	5	-0,5192	0,1850NS
Clorofila	IGA	5	0,7432	0,0750NS
O ₂	COR	5	-0,7611	0,0675*
O ₂	FR	5	-0,7101	0,0895NS
O ₂	ENC	5	0,7182	0,0859NS
O ₂	EB	5	0,6338	0,1254NS
O ₂	CO	5	0,5839	0,1506NS
O ₂	PO	5	0,4609	0,2173NS
O ₂	IGA	5	-0,6794	0,1036NS

S, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

OR - Cor

R - Frescor

NC - Escurecimento da nervura central

B - Escurecimento das bordas

O - Cozido

D - Podre

IGA - Impressão global da aparência

TABELA A8. Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, bioquímicas (FAL, pH e PFO) e sensoriais dentro da temperatura 2°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
FAL	COR	5	-0,8496	0,0342*
FAL	FR	5	-0,8829	0,0236*
FAL	ENC	5	0,8896	0,0216*
FAL	EB	5	0,8449	0,0358*
FAL	CO	5	0,7851	0,0578*
FAL	PO	5	0,6836	0,1016NS
FAL	IGA	5	-0,8568	0,0318*
pH	COR	5	-0,3916	0,2573NS
pH	FR	5	-0,3487	0,2826NS
pH	ENC	5	0,3360	0,2902NS
pH	EB	5	0,3439	0,2854NS
pH	CO	5	0,4407	0,2288NS
pH	PO	5	0,3171	0,3015NS
pH	IGA	5	-0,3828	0,2624NS
PFO	COR	5	-0,8586	0,0312*
PFO	FR	5	-0,9575	0,0052**
PFO	ENC	5	0,9620	0,0044**
PFO	EB	5	0,9536	0,0060**
PFO	CO	5	0,8951	0,0201*
PFO	PO	5	0,8206	0,0443*
PFO	IGA	5	-0,9385	0,0091**

NS, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

COR - Cor

FR - Frescor

ENC - Escurecimento da nervura central

EB - Escurecimento das bordas

CO - Cozido

PO - Podre

IGA - Impressão global da aparência

FAL - Fenilalanina amônia liase

PFO - Polifenoloxidase

TABELA A9. Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas, químicas (acidez, clorofila e CO₂) e sensoriais dentro da temperatura 10°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
Acidez	COR	5	-0,1518	0,4038NS
Acidez	FR	5	-0,5436	0,1718NS
Acidez	ENC	5	0,3965	0,2543NS
Acidez	EB	5	0,4394	0,2295NS
Acidez	CO	5	0,3104	0,3056NS
Acidez	PO	5	0,4107	0,2461NS
Acidez	IGA	5	-0,5319	0,1781NS
Clorofila	COR	5	-0,0532	0,4662NS
Clorofila	FR	5	0,3084	0,3068NS
Clorofila	ENC	5	-0,0868	0,4448NS
Clorofila	EB	5	-0,2141	0,3648NS
Clorofila	CO	5	-0,0326	0,4793NS
Clorofila	PO	5	-0,1474	0,4065NS
Clorofila	IGA	5	0,3793	0,2645NS
CO ₂	COR	5	-0,7668	0,0652*
CO ₂	FR	5	-0,9098	0,0160*
CO ₂	ENC	5	0,8493	0,0343*
CO ₂	EB	5	0,9029	0,0179*
CO ₂	CO	5	0,8227	0,0436*
CO ₂	PO	5	0,8604	0,0306*
CO ₂	IGA	5	-0,9353	0,0098**

NS, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

COR - Cor

FR - Frescor

ENC - Escurecimento da nervura central

EB - Escurecimento das bordas

CO - Cozido

PO - Podre

IGA - Impressão global da aparência

TABELA A10. Correlação de Pearson entre as variáveis físico-químicas (FAL, pH e PFO) e sensoriais dentro da temperatura 10°C.

Variável	Variável	Observações	Correlação (r)	Significância
----------	----------	-------------	----------------	---------------

FAL	COR	5	-0,9108	0,0158*
FAL	FR	5	-0,9577	0,0052**
FAL	ENC	5	0,9441	0,0079**
FAL	EB	5	0,9788	0,0018**
FAL	CO	5	0,9390	0,0090**
FAL	PO	5	0,9528	0,0061**
FAL	IGA	5	-0,9747	0,0024**
pH	COR	5	-0,9542	0,0058**
pH	FR	5	-0,7175	0,0862NS
pH	ENC	5	0,8799	0,0245*
pH	EB	5	0,8185	0,0451*
pH	CO	5	0,9123	0,0154*
pH	PO	5	0,8302	0,0409*
pH	IGA	5	-0,6859	0,1005NS
PFO	COR	5	-0,9883	0,0008**
PFO	FR	5	-0,7788	0,0603*
PFO	ENC	5	0,9058	0,0171*
PFO	EB	5	0,8769	0,0254*
PFO	CO	5	0,9397	0,0088**
PFO	PO	5	0,8706	0,0274*
PFO	IGA	5	-0,7734	0,0625*

NS, * e ** não significativo, significativo ao nível de 5 e 1% pelo teste de t

COR - Cor
 FR - Frescor
 ENC - Escurecimento da nervura central
 EB - Escurecimento das bordas
 CO - Cozido
 PO - Podre
 IGA - Impressão global da aparência

T66480552
 007
 504