

Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado

Using chlorine dioxide and peracetic acid as substitutes for sodium hypochlorite in the sanitization of minimally processed green seasoning

Silvana Mariana SREBERNICH^{1*}

Resumo

Hortalças minimamente processadas são produtos prontos para o consumo e devem estar livres de patógenos. A lavagem desses vegetais deve ser feita com água de boa qualidade e complementada com adição de solução sanitizante, visando reduzir a carga microbiológica acompanhante e minimizando a sua deterioração, ou seja, aumentando a conservação do produto e tornando-o microbiologicamente mais seguro. O hipoclorito de sódio é o único sanitizante permitido pela legislação brasileira para esse fim. Embora eficiente, seu uso tem sido questionado por ser precursor na formação de cloraminas orgânicas, compostos de alto potencial carcinogênico. Diversos sanitizantes têm sido propostos como substitutos do hipoclorito de sódio na desinfecção de hortalças, destacando entre eles o dióxido de cloro e o ácido peracético. Assim, o presente trabalho teve por objetivo verificar, através de análises microbiológicas, a eficiência do dióxido de cloro (10, 25 e 50 ppm/2, 5 e 10 minutos) e do ácido peracético (60, 80 e 100 ppm/5, 10 e 15 minutos) em comparação ao hipoclorito de sódio (120 ppm/15 minutos) no controle da microbiota acompanhante do cheiro-verde minimamente processado. As matérias-primas, salsa e cebolinha, in natura, foram submetidas à ação das soluções sanitizantes conforme tempos e concentrações pré-estabelecidos, e em seguida processadas obtendo-se as amostras de cheiro-verde. No caso da amostra-controle (testemunha), as operações de lavagem foram feitas apenas com água da rede. Os tratamentos foram repetidos em 3 épocas com intervalos de 4 meses. De cada tratamento foram coletadas 3 amostras (embalagens de 150 g) para posterior análise microbiológica de *Salmonella* sp., coliformes totais, *Escherichia coli* e contagem total de fungos. Os resultados das análises microbiológicas junto com a avaliação estatística mostraram que maiores concentrações e maiores tempos de ação dos sanitizantes propiciaram melhores resultados no controle microbiano. Entretanto, de acordo com os padrões existentes na legislação em vigor para *Salmonella* (ausência em 25 g de amostra) e para *E. coli* ($\leq 2 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$), todas as amostras analisadas neste trabalho estariam adequadas para consumo, exceto a lavada só com água. Os resultados também mostraram que o ácido peracético foi mais eficiente, e que, por outro lado, o dióxido de cloro não apresentou nenhuma vantagem sobre o hipoclorito de sódio. Mesmo assim, ambos os sanitizantes (dióxido de cloro 50 ppm/10 minutos e ácido peracético 80 ppm/5 minutos) estariam aptos a substituir o hipoclorito de sódio (120 ppm/15 minutos).

Palavras-chave: agentes sanitizantes; controle microbiológico; processamento mínimo.

Abstract

Minimally processed vegetables are ready to eat products that should be free of pathogenic microorganisms. These vegetables must be washed in good quality water, followed by the addition of a sanitizer to reduce the microbial count and minimize the product's deterioration, increasing its preservation and making it microbiologically safer. Sodium hypochlorite is the only sanitizer for this purpose allowed by Brazilian legislation. Although efficient, its use has been questioned because it is a precursor of organic chloramines, compounds of high carcinogenic potential. Many sanitizers have been proposed as substitutes of sodium hypochlorite in the disinfection of vegetables, including chlorine dioxide and peracetic acid. Therefore, based on microbial analyses, this research aimed to test the efficiency of chlorine dioxide (10, 25 and 50 ppm/2, 5 and 10 minutes) and peracetic acid (60, 80 and 100 ppm/5, 10 and 15 minutes) in comparison with sodium hypochlorite (120 ppm/15 minutes) in the control of natural microbiota of minimally processed green seasoning. The green seasoning, which consists of fresh parsley and welsch onions, was washed in various concentrations of sanitizing solutions for given times and then processed to obtain sample of green seasoning. The control sample was washed only in tap water. The treatments were repeated on 3 distinct occasions at 4-month intervals, and 3 samples (packages of 150 g) were collected from each treatment for microbial analysis of pathogenic *Salmonella* sp., total coliforms, *Escherichia coli* and total fungal count. The results of these analyses after statistical evaluation indicated that higher concentrations and longer sanitizing treatments led to better microbial control. However, according to the standards in the current legislation on *Salmonella* sp. (absent from 25 g of sample) and *E. coli* ($\leq 2 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$), all the samples analyzed here were suitable for consumption except for the control, washed only in water. In addition, peracetic acid proved more efficient than sodium hypochlorite, while chlorine dioxide did not show any advantage over sodium hypochlorite. Nevertheless, both sanitizers (chlorine dioxide 50 ppm/10 minutes and peracetic acid 80 ppm/5 minutes) proved suitable substitutes of sodium hypochlorite (120 ppm/15 minutes).

Keywords: sanitizer agents; microbial control; minimal processing.

1 Introdução

Alimentos frescos e de baixa caloria têm recebido atenção cada vez maior dos consumidores. Assim, o mercado de hortalças frescas cresceu significativamente na última década, promovendo a ascensão dos produtos processados frescos prontos

para o consumo. O propósito desses produtos é proporcionar ao consumidor um produto conveniente, muito parecido com o fresco, porém com a sua vida útil prolongada, mantendo a qualidade nutritiva e sensorial¹⁶.

O rápido crescimento desse mercado e a popularidade desses produtos aconteceram principalmente devido a dois fatores. Primeiro devido à facilidade de utilização, exigida cada vez mais nos dias de hoje, em que as pessoas dispõem de pouco tempo para o preparo dos alimentos, e também, pela diminuição do lixo doméstico^{3,11}. Em segundo lugar, por

Recebido para publicação em 24/11/2006

Aceito para publicação em 27/6/2007 (002091)

¹ Faculdade de Nutrição, Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, CP 317, CEP 13059-704, Campinas - SP, Brasil,

E-mail: srebernich@uol.com.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

assegurar uma vida de prateleira suficientemente longa para permitir distribuição e comercialização regional. Um produto minimamente processado deve ser consistente, ter aparência fresca, ser de cor aceitável, livre de defeitos e seguro do ponto de vista microbiológico¹⁷. Desta forma, o valor agregado ao produto pelo processo aumenta a sua competitividade, proporciona meios alternativos de comercialização e reduz perdas de matéria-prima.

Como as hortaliças minimamente processadas são produtos prontos para o consumo devem estar livres de patógenos. Assim, torna-se necessário que a etapa de lavagem desses vegetais seja feita com água de boa qualidade e com a adição de soluções sanitizantes, uma vez que o uso destas soluções reduz significativamente a contaminação, resultando na obtenção de produtos microbiologicamente mais seguros⁶. Portanto, a sanitização tem um importante papel na minimização da deterioração e na manutenção da qualidade do produto⁸.

Os produtos clorados, como os sais de hipoclorito, constituem o grupo de compostos sanitizantes mais utilizado. No Brasil, o hipoclorito de sódio é o único agente sanitizante permitido pela legislação⁴, e vem sendo utilizado nos vegetais minimamente processados para manter sua qualidade microbiológica. Entretanto, nos últimos anos tem existido certa preocupação quanto ao uso do hipoclorito e dos demais sais de cloro considerados precursores na formação de cloraminas orgânicas, estas prejudiciais à saúde devido ao seu alto potencial carcinogênico¹⁴. Por essa razão, diversos agentes sanitizantes têm sido propostos como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização de hortaliças. Em outros países, agentes como o vinagre, ácido acético e ácido peracético ganharam aceitação por serem considerados tão eficazes quanto o cloro, e também em função das controvérsias sobre a toxicidade do cloro nos alimentos. De modo semelhante, o dióxido de cloro vem recebendo atenção especial², pois embora seja um derivado do cloro, ele gera quantidade insignificante de subprodutos (trihalometanos) não se obtendo a formação de cloraminas, e sendo os fenóis oxidados a formas mais simples, caracterizando-se assim como um produto de baixo potencial carcinogênico¹. Além disso, o dióxido de cloro é um agente oxidante forte, que na maioria das vezes reage por meio do mecanismo de transferência de elétrons atacando a membrana celular, penetrando, desidratando, e por último, oxidando os componentes internos da célula microbiana sem, no entanto, causar ação tóxica como a maioria dos compostos de cloro. Apresenta também a vantagem de ser eficaz com os microrganismos gram negativos e gram positivos. Ainda, pelo fato de hidrolisar os compostos fenólicos diminui a possibilidade da formação de sabores e odores estranhos.

Outro aspecto importante do dióxido de cloro é sua acentuada ação sanitizante e esporicida, que se dá em concentrações menores de cloro, e que é resultante do mesmo ser solúvel em óleos, graxas e substâncias de composição mista, como células de vírus e de bactérias, em cujas membranas penetram facilmente, ao contrário dos outros sanitizantes de natureza polar. Nos últimos anos, diversos trabalhos com o dióxido de cloro foram realizados em diferentes países do mundo. Estudos realizados por FELKEY et al.¹⁰ e RASH¹⁸ mostraram

a eficiência do dióxido de cloro na redução de *Salmonella sp.* nas superfícies de tomate e melão.

O ácido peracético, também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético é outro agente sanitizante que tem sido utilizado com bastante sucesso, principalmente nos EUA. É obtido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com o peróxido de hidrogênio. Sua eficiência é semelhante ou superior a do hipoclorito de sódio¹⁵, porém mais potente que o peróxido de hidrogênio. Trata-se de um excelente sanitizante pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos microrganismos, tendo uma rápida ação a baixas concentrações sobre um amplo espectro de microrganismos. É esporicida em baixas temperaturas e continua efetivo na presença de material orgânico sendo, portanto, um biocida efetivo sem residual tóxico. Sua ação biocida é influenciada pela concentração, temperatura e tipo de microrganismos⁷. Estudo realizado por HILGREN e SALVERDA¹² mostrou redução significativa na contagem total de bactérias e fungos de hortaliças tratadas com ácido peroxiacético. Ainda segundo NASCIMENTO¹⁵, não se observou diferença significativa quanto ao desempenho do ácido peracético quando comparado ao hipoclorito de sódio. Resultados semelhantes foram apresentados por FARREL et al.⁹, SAPERS et al.²⁰ e WISNIEWSKY et al.²². Contudo outros autores demonstraram a superioridade do ácido peracético frente ao hipoclorito de sódio na presença de matéria orgânica.

Assim, embora existam inúmeros estudos relatados na literatura, muitos deles foram realizados com produtos artificialmente contaminados, utilizando-se diferentes microrganismos e condições de aplicação nem sempre comparáveis. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados sobre a eficiência dos sanitizantes nas condições reais de uso, trabalhando-se com frutas e hortaliças disponíveis no mercado local, com a sua microbiota contaminante natural inalterada. Também, torna-se interessante a implantação no setor de alimentação, de um rodízio entre os diferentes sanitizantes de modo a evitar o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos aos mesmos.

Por outro lado, devido à dificuldade de se detectar os microrganismos patogênicos, as bactérias do grupo coliformes (totais e termotolerantes) passaram a ser utilizadas como indicadores das condições higiênicas no controle microbiológico dos produtos, desde que a presença de bactérias do grupo dos coliformes esteja associada à possível presença de patógenos. Portanto, se forem monitoradas as bactérias coliformes, indiretamente os patógenos estarão também sob controle¹³.

Assim, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a eficácia do dióxido de cloro e do ácido peracético, em diferentes concentrações e tempos de ação, como agentes sanitizantes adicionados à água de lavagem empregada no processamento de cheiro-verde minimamente processado, visando o controle da microbiota acompanhante desse produto e, também, se possível, a substituição do hipoclorito de sódio (precursor de cloraminas orgânicas) nesse processo. A escolha do cheiro-verde como material de estudo resultou de pesquisa prévia, onde entre as hortaliças minimamente processadas e comercializadas na cidade de Campinas ele foi a que apresentou

maior contaminação e, também, por ser um produto de amplo consumo sendo utilizado como condimento em todas as regiões do país.

2 Material e métodos

2.1 Matéria-prima

Salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex. A.W. Hill) e cebolinha (*Allium fistulosum* L.) in natura, matérias-primas componentes do cheiro-verde (mistura 1:1), foram adquiridas em Campinas diretamente do produtor.

2.2 Agentes sanitizantes

Foram empregados dióxido de cloro (ClO_2) e ácido peracético ($\text{CH}_3\text{-COOOH}$) em três diferentes concentrações, tendo como padrão o hipoclorito de sódio (NaOCl) a 120 ppm. As soluções dos agentes sanitizantes foram preparadas através de diluição do produto comercial em água destilada estéril.

2.3 Sanitização das amostras

As amostras de cheiro-verde foram processadas e sanitizadas conforme fluxograma apresentado na Figura 1 e de acordo com os tratamentos apresentados na Tabela 1.

2.4 Análise microbiológica

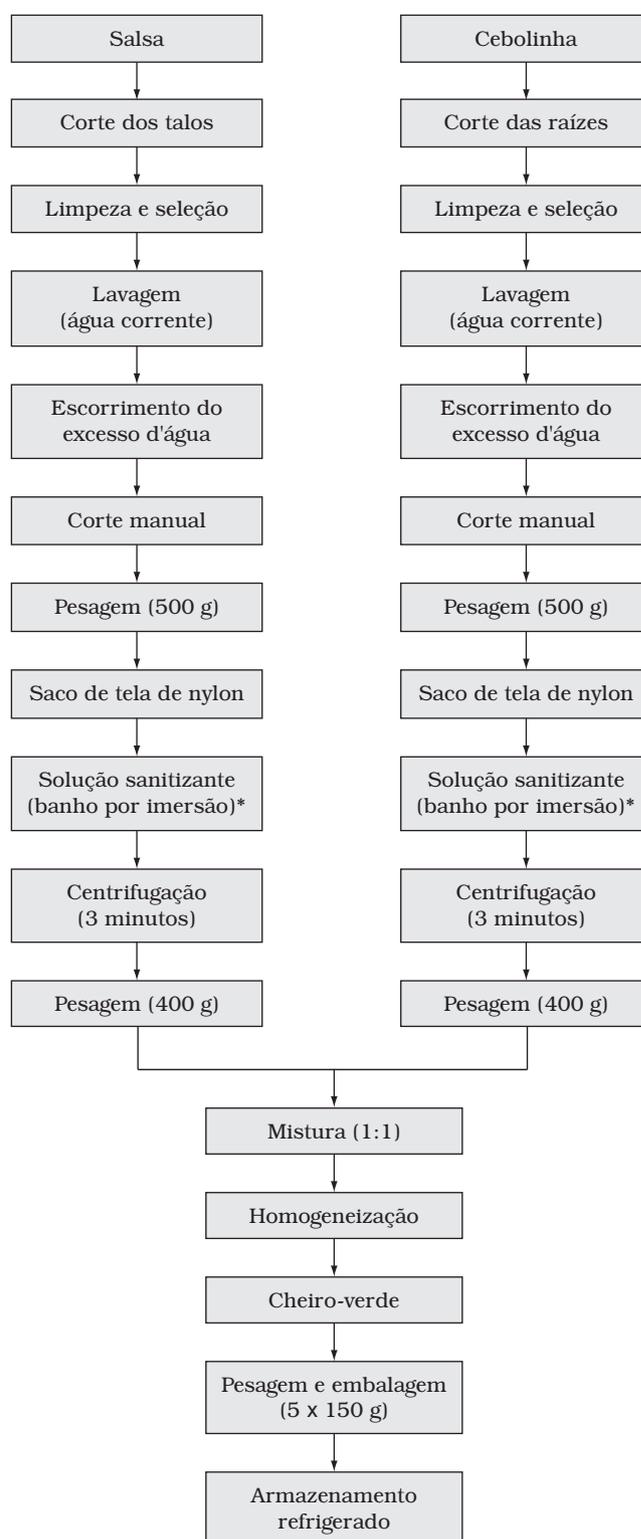
Foram realizadas análises microbiológicas de coliformes e de *Salmonella* sp. (patógenos relevantes em saúde pública) e de fungos (deteriorantes potenciais) na amostra testemunha (matéria-prima apenas lavada com água da rede) e nas amostras submetidas aos tratamentos por imersão em soluções contendo os agentes sanitizantes dióxido de cloro, ácido peracético e hipoclorito de sódio (padrão). Todas as análises foram feitas em triplicata e em três épocas diferentes, conforme cronograma apresentado na Tabela 1. Os resultados, média de três determinações, foram expressos em logaritmo de unidades formadoras de colônias por grama de amostra ($\log\text{UFC.g}^{-1}$). As metodologias utilizadas são descritas a seguir.

Coliformes totais com diferenciação para *Escherichia coli*

A análise de coliformes totais foi feita empregando-se o método do Petrifilm 3M® 6410 conforme descrito em SILVA et al.²¹. As contagens foram feitas após um período de incubação de 24 horas a 35 °C, sendo os resultados expressos em logaritmo das unidades formadoras de colônias por grama de hortaliça ($\log\text{UFC.g}^{-1}$).

Contagem total de fungos

A contagem total de fungos foi realizada através da metodologia de plaqueamento em superfície, descrita em SILVA et al.²¹, pesando-se 25 g de amostra, adicionando-se 225 mL do diluente (água salina peptonada a 0,1%) e homogeneizando-se a seguir (em homogeneizador de pistão tipo Stromacher



*Diferentes tempos e diferentes concentrações em função dos diferentes tratamentos

Figura 1. Fluxograma do processamento para obtenção do cheiro-verde minimamente processado.

Blend 400). Posteriormente fez-se diluição em série e semeou-se em meio específico para fungos (Ágar Dicloram Rosa de Bengala Cloranfenicol – DRBC). As contagens foram feitas após 3 e 5 dias de incubação a 25 °C.

Tabela 1. Tratamentos resultantes de combinações de tempo de contato e de concentração das soluções sanitizantes sobre o cheiro-verde minimamente processado.

Tratamento com solução sanitizante			
Dióxido de cloro		Ácido peracético	
Concentração (ppm)	Tempo (minutos)	Concentração (ppm)	Tempo (minutos)
10	2	60	5
	5		10
	10		15
25	2	80	5
	5		10
	10		15
50	2	100	5
	5		10
	10		15
Água (testemunha)		Hipoclorito de sódio (padrão)	
-	15	120	15

Isolamento e identificação de *Salmonella* sp.

Utilizou-se o método tradicional de análise (presença ou ausência), onde 25 g do produto foram postos para pré-enriquecimento em água peptonada tamponada e incubada a 35 °C por 24 horas, após o que se fez a determinação conforme metodologia descrita em SILVA et al.²¹.

2.5 Análise estatística

Os resultados das análises microbiológicas, relativos às populações de fungos, coliformes totais e *E. coli* foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey de comparação de médias ao nível de 5% ($p < 0,05$) empregando-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*)¹⁹.

3 Resultados e discussão

A legislação brasileira determina como padrão microbiológico para hortaliças, legumes e similares frescos, in natura,

Tabela 2. Resultados da ação dos sanitizantes dióxido de cloro e ácido peracético em função de concentração e tempo de contato na população de fungos, expressos em logUFC.g⁻¹, em amostras de cheiro-verde minimamente processadas.

Tratamento com dióxido de cloro (ClO ₂)				
Concentração (ppm)	Tempo de contato			DMS ¹
	2 minutos	5 minutos	10 minutos	
10	5,53 ± 0,19 ^{Aa}	5,10 ± 0,32 ^{Ba}	4,37 ± 0,14 ^{Ca}	0,27
25	4,10 ± 0,22 ^{Ab}	3,76 ± 0,14 ^{Bb}	3,44 ± 0,15 ^{Cb}	0,20
50	3,28 ± 0,15 ^{Ac}	3,16 ± 0,13 ^{Ac}	2,88 ± 0,25 ^{Bc}	0,22
DMS ²	0,22	0,26	0,22	-
Tratamento com ácido peracético (CH ₃ -COOOH)				
Concentração (ppm)	Tempo de contato			DMS ¹
	5 minutos	10 minutos	15 minutos	
60	3,78 ± 0,12 ^{Aa}	3,58 ± 0,22 ^{ABa}	3,47 ± 0,15 ^{Ba}	0,20
80	2,55 ± 0,19 ^{Ab}	2,24 ± 0,12 ^{Bb}	2,11 ± 0,08 ^{Bb}	0,16
100	2,05 ± 0,09 ^{Ac}	1,86 ± 0,05 ^{Bc}	1,04 ± 0,04 ^{Cc}	0,08
DMS ²	0,17	0,18	0,12	-
Testemunha (água da rede/15 minutos)*			5,80 ± 0,09	
Padrão (hipoclorito de sódio: 120 ppm/15 minutos)*			2,58 ± 0,20	

Médias de três repetições analíticas ± desvio-padrão; DMS¹ e DMS² = diferença mínima significativa relativa às médias das linhas e das colunas respectivamente; letras diferentes na mesma linha (maiúscula) ou na mesma coluna (minúscula) indicam que as médias diferem significativamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade; e *Tratamentos de referência.

preparados para consumo direto, ausência de *Salmonella* em 25 g do produto e nível máximo de coliformes a 45 °C igual a 10² UFC.g⁻¹ ou 2 logUFC.g⁻¹. Por outro lado, a mesma legislação não estabelece parâmetros e tampouco faz qualquer referência a fungos (microrganismos deteriorantes potenciais) e nem a coliformes totais (deteriorantes potenciais além de pertencerem ao grupo dos bioindicadores de higiene dos alimentos). Entretanto, mesmo não havendo parâmetros na legislação, BERBARI et al.⁵ afirmam que populações de coliformes totais no nível de 10⁵ (5 log) UFC.g⁻¹ e de fungos no nível de 10⁴ (4 log) UFC.g⁻¹ correspondem à elevada contaminação desses microrganismos no produto. Estes autores afirmam, também, que quando a operação de lavagem com água de rede é corretamente efetuada, deve-se esperar uma redução inicial de dois ciclos logarítmicos na contagem de coliformes totais, e de um ciclo logarítmico na contagem de fungos. No presente trabalho, dados referentes a *Salmonella* sp. não são apresentados pois a sua presença não foi constatada em nenhuma amostra, não sendo assim um fator de risco à saúde do consumidor.

Analisando os dados da Tabela 2, verifica-se inicialmente que todos os tratamentos apresentaram alguma redução na população de fungos, sendo esta redução muito maior para os tratamentos realizados com o ácido peracético do que para aqueles realizados com dióxido de cloro, evidenciando assim maior eficiência do primeiro sobre o segundo (dentro dos níveis de concentração e de tempo de contato estudados; diferentes para o dióxido de cloro e ácido peracético).

Verifica-se também, que os parâmetros tempo de contato e concentração influíram significativamente (nível de 5%) na contagem de fungos mostrando-se inversamente proporcionais à população naturalmente presente no cheiro-verde minimamente processado. Observa-se ainda, que as diferenças se mostraram mais significativas quando se manteve fixo o tempo de contato variando-se a concentração (dados observados nas colunas; as médias estão sempre acompanhadas de letras diferentes). Por outro lado, quando se manteve fixa a concentração e variável o tempo de contato (dados observados nas linhas), as diferenças, embora significativas, foram menos acentuadas

com a ocorrência de médias sem diferença estatística (médias seguidas de mesmas letras; tratamentos com dióxido de cloro: 50 ppm/2 e 5 minutos e tratamentos com ácido peracético: 60 ppm/5 e 10 minutos e 80 ppm/10 e 15 minutos). Conclui-se, portanto, que o efeito do tempo de contato foi menos marcante que o efeito da concentração.

Ainda, os dados da Tabela 2 mostram que entre os 9 tratamentos feitos com dióxido de cloro apenas 1 (50 ppm/10 minutos – 2,88 logUFC.g⁻¹) se aproximou do resultado obtido com o tratamento padrão (hipoclorito de sódio: 120 ppm/15 minutos – 2,58 logUFC.g⁻¹). Neste tratamento a população alvo foi reduzida em cerca de três ciclos logarítmicos quando comparada com a do tratamento testemunha (lavagem com água). Se comparadas com o tratamento padrão, as populações se encontram no mesmo nível, isto é, 2 logUFCg⁻¹. Conclui-se assim, que para reduzir a contagem de fungos ao mesmo nível do padrão utilizando dióxido de cloro há necessidade de se tratar o cheiro-verde minimamente processado com no mínimo 50 ppm/10 minutos.

Referente ao efeito do ácido peracético na população de fungos, os dados da Tabela 2 mostram que em relação ao tempo de contato, os tratamentos mais eficientes foram os de 15 minutos, e que o tempo de 10 minutos não se mostrou diferente do tempo de 15 minutos nas concentrações de 60 e 80 ppm. Quanto às concentrações estudadas, a de 100 ppm foi significativamente superior às demais, principalmente no tempo de 15 minutos, reduzindo a população alvo em quatro ciclos logarítmicos, resultado este superior ao do tratamento padrão cujo nível populacional ficou um ciclo logarítmico acima. Entretanto, a partir de 80 ppm todos os tratamentos propiciaram contagem menor que a do padrão, independente dos tempos considerados. Todavia, com maiores tempos obteve-se melhores resultados. Assim, dos 9 tratamentos realizados com ácido peracético, 6 deles (80 ppm e 100 ppm/5, 10 e 15 minutos, respectivamente) propiciaram redução na contagem de fungos igual ou superior ao padrão. Desse modo, se for utilizado o ácido peracético no controle de fungos em

cheiro-verde minimamente processado recomenda-se como condições mínimas 80 ppm/5 minutos.

Numa análise geral dos dados da Tabela 3, verifica-se que de modo semelhante aos dados da Tabela 2, todos os tratamentos apresentaram certa redução na população de coliformes totais, sendo esta redução muito maior para os tratamentos realizados com o ácido peracético que para aqueles realizados com dióxido de cloro (dentro dos níveis de concentração e de tempo de contato estudados; diferentes para o dióxido de cloro e ácido peracético). Observa-se também, que o dióxido de cloro e o ácido peracético influíram significativa (nível de 5%) e inversamente proporcional às ações dos parâmetros tempo de contato e concentração na população de coliformes totais presentes no cheiro-verde minimamente processado, sendo novamente a ação do dióxido de cloro menos eficiente que a ação do ácido peracético.

Ainda pelos dados da Tabela 3, verifica-se que as diferenças entre as médias são maiores em função da variação da concentração (médias apresentadas nas colunas) do que em função da variação do tempo de contato (médias apresentadas nas linhas), embora em termos estatísticos se apresentem de forma semelhante (diferentes letras para diferentes médias) enfatizando uma ação mais significativa e também equilibrada desses parâmetros se comparados com os dados da Tabela 2.

Referente aos tratamentos realizados com dióxido de cloro, verifica-se que apenas 3 deles (50 ppm/2, 5 e 10 minutos) propiciaram contagem de coliformes totais no mesmo nível do padrão (5 logUFC.g⁻¹), ou seja, propiciaram uma redução de cerca de 3 ciclos logarítmicos quando comparada à contagem do tratamento testemunha (lavagem com água). Portanto, para reduzir a população de coliformes totais presente no cheiro-verde minimamente processado ao nível propiciado pelo padrão, recomenda-se o tratamento com dióxido de cloro a partir de 50 ppm/10 minutos.

Relativo ao efeito do ácido peracético, nota-se uma redução contínua da população dos coliformes totais em função do au-

Tabela 3. Resultados da ação dos sanitizantes dióxido de cloro e ácido peracético em função de concentração e tempo de contato na população de coliformes totais, expressos em logUFC.g⁻¹, em amostras de cheiro-verde minimamente processadas.

Tratamento com dióxido de cloro (ClO ₂)				
Concentração (ppm)	Tempo de contato			DMS ¹
	2 minutos	5 minutos	10 minutos	
10	7,78 ± 0,09 ^{Ab}	7,24 ± 0,12 ^{Ba}	6,85 ± 0,07 ^{Ca}	0,11
25	6,66 ± 0,11 ^{Ab}	6,43 ± 0,14 ^{Bb}	6,04 ± 0,12 ^{Cb}	0,15
50	5,85 ± 0,10 ^{Ac}	5,66 ± 0,06 ^{Bc}	5,52 ± 0,08 ^{Cc}	0,10
DMS ²	0,12	0,13	0,11	-
Tratamento com ácido peracético (CH ₃ -COOOH)				
Concentração (ppm)	Tempo de contato			DMS ¹
	5 minutos	10 minutos	15 minutos	
60	5,79 ± 0,07 ^{Aa}	5,50 ± 0,07 ^{Ba}	5,27 ± 0,10 ^{Ca}	0,10
80	4,93 ± 0,04 ^{Ab}	4,76 ± 0,09 ^{Bb}	4,47 ± 0,09 ^{Cb}	0,09
100	4,16 ± 0,08 ^{Ac}	3,85 ± 0,07 ^{Bc}	3,37 ± 0,10 ^{Cc}	0,10
DMS ²	0,08	0,09	0,11	-
Testemunha (água da rede/15 minutos)*			8,18 ± 0,11	
Padrão (hipoclorito de sódio: 120 ppm/15 minutos)*			5,24 ± 0,11	

Médias de três repetições analíticas ± desvio-padrão; DMS¹ e DMS² = diferença mínima significativa relativa às médias das linhas e das colunas respectivamente; letras diferentes na mesma linha (maiúscula) ou na mesma coluna (minúscula) indicam que as médias diferem significativamente entre si ao nível de 5% (p < 0,05) de probabilidade; * Tratamentos de referência.

mento do tempo de contato e da concentração do sanitizante, sendo que dos 9 tratamentos realizados, 6 propiciaram contagem inferior ao padrão, enquanto os outros 3 propiciaram resultados no mesmo nível ($5 \log\text{UFC.g}^{-1}$). Verifica-se também, que o efeito da concentração se mostrou maior que o efeito do tempo de contato, e que maiores concentrações e tempos de contato propiciaram melhores resultados (maiores reduções na população alvo). Assim, a partir de 80 ppm obtiveram-se reduções na população alvo superiores às propiciadas pelo tratamento padrão (hipoclorito de sódio: 120 ppm/15 minutos). Em suma, no caso da utilização do ácido peracético, todos os tratamentos realizados a partir de 80 ppm podem ser considerados suficientemente eficientes para reduzir o nível populacional um ciclo logarítmico abaixo ao do padrão. Portanto, no caso de se utilizar o ácido peracético para reduzir a população de coliformes totais em cheiro-verde minimamente processado ao mesmo nível do padrão, recomenda-se que se respeite como condições mínimas 80 ppm/5 minutos.

Quanto ao controle da população de *E. coli*, verifica-se pela análise dos dados da Tabela 4 que, de modo geral, os resultados estão muito próximos, independente do agente sanitizante utilizado. Entretanto, quando o agente sanitizante utilizado foi o dióxido de cloro existiram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Estas diferenças se mostraram mais significativas quando se manteve fixo o tempo de contato variando-se a concentração (dados observados nas colunas). Por outro lado, quando se manteve fixa a concentração e variável o tempo de contato (dados observados nas linhas), só ocorreu diferença significativa entre os tratamentos realizados na concentração de 10 ppm. Nas demais concentrações, os resultados se mostraram estatisticamente iguais. Assim, numa análise geral dos dados da Tabela 4 relativos ao uso do dióxido de cloro, pode-se dizer que o tratamento feito com 25 ppm de dióxido de cloro por 2 minutos foi tão eficiente quanto o tratamento feito com 50 ppm por 10 minutos, e que o efeito do tempo de contato foi menos marcante que o efeito da concentração.

Por outro lado, quando o agente sanitizante utilizado foi o ácido peracético, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, não sendo possível identificar um tratamento mais eficiente dentro das concentrações e tempos estudados. Portanto, com base nos dados da Tabela 4, para o controle da população de *E. coli* com dióxido de cloro, o tratamento do cheiro-verde com 25 ppm/2 minutos já seria suficiente. No caso de se utilizar o ácido peracético, o tratamento com 60 ppm/5 minutos (menor concentração e menor tempo e tão eficiente quanto aos demais tratamentos) já seria suficiente. Entretanto, quando se considera os resultados das Tabelas 2, 3 e 4 em conjunto, torna-se necessário estabelecer como parâmetros recomendáveis 50 ppm/10 minutos no caso do dióxido de cloro, e 80 ppm/5 minutos no caso do ácido peracético, de modo a se ter um controle equivalente ao do padrão (hipoclorito de sódio 120 ppm/15 minutos).

Finalizando, pode-se dizer que a matéria-prima utilizada (testemunha, apenas lavada com água de rede) apresentou alta contaminação por coliformes totais ($8,18 \log\text{UFC.g}^{-1}$) e, de certo modo, por fungos ($5,80 \log\text{UFC.g}^{-1}$), e contaminação média ($2,86 \log\text{UFC.g}^{-1}$) por *E. coli* (indicador de contaminação por material fecal). Quanto aos agentes sanitizantes utilizados, quando se considera todos os tratamentos realizados e os resultados obtidos para os diferentes microrganismos nas análises microbiológicas, conclui-se que tanto o dióxido de cloro como o ácido peracético estão aptos a substituir o hipoclorito de sódio (120 ppm/15 minutos). No caso do dióxido de cloro, para garantir resultados iguais ou superiores ao do padrão seria conveniente trabalhar com concentração > 50 ppm, provavelmente 60 ppm/10 minutos, e no caso do ácido peracético, 80 ppm/5 minutos já propiciaria resultados melhores que os do hipoclorito de sódio (padrão).

4 Conclusões

Os resultados observados no presente trabalho levam às seguintes conclusões:

Tabela 4. Resultados da ação dos sanitizantes dióxido de cloro e ácido peracético em função de concentração e tempo de contato na população de *Escherichia coli*, expressos em $\log\text{UFC.g}^{-1}$, em amostras de cheiro-verde minimamente processadas.

Tratamento com dióxido de cloro (ClO_2)				
Concentração (ppm)	Tempo de contato			DMS ¹
	2 minutos	5 minutos	10 minutos	
10	$1,27 \pm 0,10^{\text{Aa}}$	$1,18 \pm 0,11^{\text{ABa}}$	$1,14 \pm 0,08^{\text{Ba}}$	0,12
25	$1,08 \pm 0,08^{\text{Ab}}$	$1,06 \pm 0,07^{\text{Ab}}$	$1,03 \pm 0,04^{\text{Ab}}$	0,07
50	$1,01 \pm 0,01^{\text{Ab}}$	$1,00 \pm 0,00^{\text{Ab}}$	$1,00 \pm 0,00^{\text{Ab}}$	0,01
DMS ²	0,09	0,09	0,06	-
Tratamento com ácido peracético ($\text{CH}_3\text{-COOOH}$)				
Concentração (ppm)	Tempo de contato			DMS ¹
	5 minutos	10 minutos	15 minutos	
60	$1,02 \pm 0,04^{\text{Aa}}$	$1,01 \pm 0,01^{\text{Aa}}$	$1,00 \pm 0,00^{\text{Aa}}$	0,03
80	$1,00 \pm 0,00^{\text{Aa}}$	$1,00 \pm 0,00^{\text{Aa}}$	$1,00 \pm 0,00^{\text{Aa}}$	0,00
100	$1,00 \pm 0,00^{\text{Aa}}$	$1,00 \pm 0,00^{\text{Aa}}$	$1,00 \pm 0,00^{\text{Aa}}$	0,00
DMS ²	0,03	0,01	0,00	-
Testemunha (água da rede/15 minutos)*			$2,86 \pm 0,10$	
Padrão (hipoclorito de sódio: 120 ppm/15 minutos)*			$1,00 \pm 0,00$	

Médias de três repetições analíticas \pm desvio-padrão; DMS¹ e DMS² = diferença mínima significativa relativa às médias das linhas e das colunas respectivamente; letras diferentes na mesma linha (maiúscula) ou na mesma coluna (minúscula) indicam que as médias diferem significativamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade; * Tratamentos de referência.

- O cheiro-verde mostrou ser um produto altamente contaminado, apresentando alta população de coliformes totais e de fungos, sendo estes microrganismos os mais significativos no produto;
- Quanto a *E. coli*, todos os tratamentos estudados mostraram-se igualmente eficientes, não havendo crescimento populacional expressivo com contagens baixas, ao redor de 1 logUFC.g⁻¹;
- Quando se utilizou o dióxido de cloro, o tratamento com 50 ppm/10 minutos foi o que se mostrou mais eficiente, praticamente no mesmo nível do padrão (para se obter resultado superior ao padrão seria conveniente trabalhar com concentração > 50 ppm, provavelmente na faixa de 60 ppm/10 minutos);
- Quando se utilizou o ácido peracético, o tratamento com 100 ppm/15 minutos foi o que se mostrou mais eficiente, porém o tratamento com 80 ppm/5 minutos já ofereceu resultado igual ou superior ao padrão;
- Entre todos os tratamentos estudados, o que se mostrou mais eficiente (relativo à redução das populações microbianas estudadas) foi o ácido peracético na concentração de 100 ppm/15 minutos;
- Considerando todos os tratamentos realizados e os resultados obtidos para os diferentes microrganismos nas análises microbiológicas, pode-se dizer que tanto o dióxido de cloro (50 ppm/10 minutos) como o ácido peracético (80 ppm/5 minutos) estão aptos a substituir o hipoclorito de sódio (120 ppm/15 minutos);
- Somente a utilização de água da rede não foi suficiente para sanitizar o cheiro-verde; e
- Todas as amostras estudadas estavam de acordo com a legislação para alimentos⁴.

Referências bibliográficas

1. ANDRADE, J. N.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo, Varela, 1996. 182 p.
2. ARENSTEIN, I. R. Dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa: coadjuvante tecnológico de alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 107, p. 32-33, 2003.
3. BARRIGA, M. I. et al. Microbial changes in shedded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 47-58, 1991.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC-12/01, de 2 de Janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.
5. BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 197-201, 2001.
6. BEUCHAT, L. R. Standardization of methods to determine the efficacy of disinfectants for raw fruits and vegetables. In: TUIJTELAARS, A. C. J. et al. (Ed.). Food microbiology and food safety into the next millenium. **International Conference Of International Committee On Food Microbiology And Hygiene**, 17th., 1999, Vendhoven, The Netherlands. **Proceedings...** Vendhoven, The Netherlands, 1999. p.785-786.
7. BLOCK, S. S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1991. p. 167- 181.
8. BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 10, p. 808-814, 1992.
9. FARREL, B. L. et al. Attachment of *E. coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. **Journal of Food Protection**. v. 61, n. 7, p. 817-22, 1998.
10. FELKEY, K. D. et al. Optimization of chlorine treatments and the effects on survival of *Salmonella* spp. on tomato surfaces. In: ANNUAL MEETING OF IAFP (International Association for Food Protection), 90th., 2003, New Orleans. **Program and Abstract Book...** New Orleans, 2003. Abstract P212, p. 132.
11. GARG, N.; CHUREY, J. J.; SPLITTSTOESSER, D. F. Effect of processing conditions on the microflora of fresh cut vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 8, p. 701-703, 1990.
12. HILGREN, J. D.; SALVERDA, J. A. Antimicrobial efficacy of a peroxyacetic/octanoic acid mixture in fresh-cut-vegetable process waters. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1376-1379, 2000.
13. KAWAMURA, K. et al. Microbial indicators for the efficiency of disinfection process. **Water Science Technology**, v. 18, n. 10, p. 175-184, 1986.
14. McNEAL, T. P.; HOLLIFIELD, H. C.; DIACHENKO, G. W. Survey of trihalomethanes and other volatile chemical contaminants in processed foods by purge-and-trape capillary gas chromatography with mass selective detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 78, n. 2, p. 391-397, 1995.
15. NASCIMENTO, M. S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. 2002. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.
16. OLIVEIRA, E. C. M.; VALLE, R. H. P. Aspectos microbiológicos dos produtos hortícolas minimamente processados. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 78/79, p. 50-54, 2000.
17. PEREIRA, J. L.; MIYA, N.; MAISTRO, L. C. Importância da enumeração rápida de bactérias patogênicas em vegetais folhosos minimamente processados: uma análise. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 89, p. 15-21, 2001.
18. RASH, V. A. Physical and chemical treatments for control of *Salmonella* on cantaloupe rinds. In: ANNUAL MEETING OF IAFP (International Association for Food Protection), 90th., 2003, New Orleans. **Program and Abstract Book...** New Orleans, 2003. Abstract P240, p. 142.
19. S. A. S. INSTITUTE. **User's guide: Statistics**. Version 6. 1. 2. Cary, U. S. A. North Carolina State University, 1996. CD-ROM.
20. SAPERS, G. M. et al. Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *E. coli* in Golden Delicious apples. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p. 734-737, 1999.
21. SILVA, N. et al. **Manual de análise microbiológica de alimentos**. 2º ed. São Paulo: Varela, 2001. p. 318.
22. WISNIEWSKY, M. A. et al. Reduction of *E. coli* O157:H7 counts on whole fresh apples by treatment with sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 6, p. 703-708, 2000.