

PALHARINI MCA; SANTOS CAJP; SIMIONATO EMRS; KODAWARA RK; KLUGE RA. 2015. Dióxido de cloro no controle da microbiota e do escurecimento enzimático de vagem minimamente processada. *Horticultura Brasileira* 33: 181-188. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000200008>

Dióxido de cloro no controle da microbiota e do escurecimento enzimático de vagem minimamente processada

Maria CA Palharini¹; Claudia AJP Santos¹; Eliane MRS Simionato²; Renata K Kodawara³; Ricardo A Kluge³

¹Polo Regional Centro Oeste, APTA/SAA, Av. Rodrigues Alves 40-40, 17030-000, Bauru-SP; mcarruda@apta.sp.gov.br; claudia_line@hotmail.com; ²Universidade Sagrado Coração, R. Irmã Arminda 10-50, 17011-160, Bauru-SP; esimionato@usc.br; ³ESALQ, C. Postal 9, 13418-260, Piracicaba-SP, renata_kodawara@usp.br; rakluge@usp.br

RESUMO

A sanificação dos vegetais deve ser realizada visando à obtenção de um alimento microbiologicamente seguro. Dentre os sanitizantes, o cloro, nas suas diversas formas, é o mais utilizado em alimentos. A utilização de cloro na forma de dióxido de cloro é interessante, uma vez que este não reage com a matéria orgânica, não formando trihalometanos, os quais têm sido identificados como substâncias cancerígenas. Além disso, o dióxido de cloro é efetivo contra organismos patogênicos e pode minimizar reações de escurecimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da sanificação com dióxido de cloro em minimizar o escurecimento enzimático e reduzir micro-organismos em vagem minimamente processada. Vagens minimamente processadas foram inoculadas por imersão em solução contaminante de *E. coli* e *Salmonella* e sanificadas com dióxido de cloro (0, 50, 100 e 200 mg/L) por 10 minutos. A população de micro-organismos foi monitorada imediatamente após a sanificação e no quarto dia de armazenamento a 10°C. Em outro experimento, as vagens minimamente processadas e sanificadas com dióxido de cloro (0, 50, 100 e 200 mg/L) por 10 minutos foram armazenadas a 10°C e avaliadas periodicamente durante 7 dias de armazenamento quanto à: coloração da superfície de corte, pH, atividade das enzimas fenilalanina-amônia-liase (PAL), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), teor de clorofila e carotenoides e aspectos microbiológicos. A sanificação com dióxido de cloro reduziu a contagem de *Salmonella* e *E. coli*, sendo essa redução proporcional ao aumento na concentração do sanificante. Também houve redução na contagem de bactérias psicrófilas nas vagens sanificadas com 100 e 200 mg/L. A contagem de coliformes totais reduziu conforme o aumento da concentração da solução sanificante. Em relação aos coliformes termotolerantes, a contagem foi baixa em todos os tratamentos, atingindo o máximo de $2,4 \times 10^{-1}$ NMP/g e não foi detectada *Salmonella*. O escurecimento da superfície de corte das vagens não foi controlado pelo dióxido de cloro, sendo similar em todos os tratamentos, assim como as atividades da PAL, POD e PPO e o teor de pigmentos (clorofila e carotenoides). Conclui-se que o dióxido de cloro não é eficaz em minimizar o escurecimento da superfície de corte das vagens minimamente processadas, mas contribui significativamente na redução da população microbiana, sendo indicada a sanificação com 200 mg/L e tempo de imersão de 10 minutos.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, sanificação, microbiologia.

ABSTRACT

Chlorine dioxide on microbiological control and enzymatic browning of minimally processed snap bean

The sanitization of processed vegetable should be carried out in order to obtain a microbiologically safe food. Among sanitizers, chlorine, in its various forms, is the most widely used in food. The use of chlorine as chlorine dioxide is interesting since it does not react with the organic material, avoiding formation of trihalomethanes, which have been identified as carcinogens. Also chlorine dioxide is effective against pathogenic organisms and can minimize browning reactions. The objective of this study was to evaluate the efficacy of sanitization with chlorine dioxide to reduce the enzymatic browning and the microorganisms in minimally processed snap bean. Minimally processed snap bean samples were inoculated by immersion in contaminant solution of *E. coli* and *Salmonella*. Afterwards, the product was sanitized with chlorine dioxide (0; 50; 100 and 200 mg/L) for 10 minutes. The pathogens were monitored immediately after sanitization during four days of storage at 10°C. In other experiment, minimally processed snap bean samples were sanitized with chlorine dioxide (0; 50; 100 and 200 mg/L) for 10 minutes and stored at 10°C and evaluated periodically during seven days of storage. The surface color, pH, activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO), chlorophyll and carotenoids content, and microbiological aspects were evaluated. The sanitization with chlorine dioxide reduced the counting of *E. coli* and *Salmonella*. This reduction was proportional to the increase of chlorine dioxide concentration. Reduction in psychrotrophic bacteria was also noticed in snap bean sanitized with 100 and 200 mg/L. Counting of total coliforms decreased with increasing of the sanitizing solution. The thermotolerant coliform counting was low in all treatments, reaching a maximum of 2.4×10^{-1} NMP/g and *Salmonella* was not detected in the samples. The browning of the section surface of snap bean was not controlled by chlorine dioxide, being similar in all treatments, as well as activity of the enzymes related to browning (PAL, POD and PPO) and content of pigments (chlorophyll and carotenoids). Chlorine dioxide was not effective in minimizing browning in minimally processed snap bean, but is effective for reducing microorganisms. Sanitizing with chlorine dioxide at a concentration of 200 mg/L during 10 minutes is indicated to ensure a safe product.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, sanitization, microbiology.

(Recebido para publicação em 28 de março de 2014; aceito em 13 de dezembro de 2014)
(Received on March 28, 2014; accepted on December 13, 2014)

O feijão-vagem é uma hortaliça de grande importância no mercado. Em 2013 ocupou a 6ª posição no ranking do setor de hortaliças mais vendidos em valor financeiro, com aproximadamente R\$ 69 milhões, correspondendo a 3,9% e a 13º em volume de tonelage com aproximadamente 19 mil toneladas, 2,2% em 30 variedades de hortaliças. (Ceagesp, 2014).

O interesse dos consumidores por produtos práticos e saudáveis, características inerentes aos vegetais minimamente processados, tem sido cada vez maior. No entanto, esses produtos apresentam perda de qualidade acelerada durante o armazenamento e distribuição. Isso acontece devido ao estresse mecânico decorrente do processamento, sendo o amolecimento, as mudanças na coloração, especialmente aumento do escurecimento oxidativo nas superfícies cortadas e a contaminação microbiana alguns dos sinais visuais de deterioração (Brecht *et al.*, 2007).

Em vagem minimamente processada, a principal causa de deterioração é o escurecimento da superfície de corte. As reações que levam ao escurecimento iniciam-se logo após o corte, em reposta ao estresse mecânico. Sob esse tipo de estresse há aumento da atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), a qual catalisa um passo limitante no metabolismo dos fenilpropanóides. O escurecimento ocorre quando produtos do metabolismo dos fenilpropanóides, como vários fenólicos e outros substratos são oxidados em reações catalisadas por fenolases como a polifenoloxidase (PPO) e a peroxidase (POD) (Brecht *et al.*, 2007).

Outra causa de deterioração da vagem é a contaminação microbiana. As operações envolvidas no processamento mínimo podem facilitar o crescimento microbiano (Tomás-Callejas *et al.*, 2012). A presença de células injuriadas e a perda de componentes celulares durante as operações de processamento propiciam ótimas condições para o desenvolvimento de micro-organismos. O tipo e a espécie, assim como o nível microbiano nos produtos minimamente processados variam de acordo com o vegetal, as práticas de cultivo, as condições higiênicas durante o manuseio e

processamento, a temperatura de armazenamento, entre outros fatores (Artés *et al.*, 2007).

A RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que os alimentos minimamente processados tenham controle microbiológico por meio das análises de *Salmonella* e coliformes termotolerantes (Brasil, 2001).

Diversos sanificantes têm sido utilizados para redução dos micro-organismos presentes nos vegetais. Dentre eles, o cloro, nas suas diversas formas, é o mais utilizado. No entanto, a reação do cloro livre com a matéria orgânica pode formar trihalometanos, os quais têm sido conhecidos por seus efeitos carcinogênicos e mutagênicos (Artés *et al.*, 2009). A utilização de cloro na forma de dióxido de cloro é uma alternativa, uma vez que não há formação de trihalometanos e o mesmo é efetivo em uma ampla faixa de pH, sendo altamente efetivo contra organismos patogênicos (Artés *et al.*, 2009). Além disso, pesquisas relatam que o dióxido de cloro minimiza reações de escurecimento (Du *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Saengnil *et al.*, 2014).

Apesar de relatos da eficácia do dióxido de cloro em controlar micro-organismos e minimizar o escurecimento de vegetais, não há dados disponíveis sobre sua eficácia em vagem. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da sanificação com dióxido de cloro no controle da microbiota e do escurecimento enzimático de vagem minimamente processada.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito do dióxido de cloro sobre a população de *E. coli* e *Salmonella* inoculadas em vagens minimamente processadas

Processamento das vagens - As vagens (cultivar Itatiba II) adquiridas em central de abastecimento foram selecionadas quanto à ausência de defeitos. Posteriormente, foram resfriadas em câmara fria (10°C por 12 h), lavadas em água corrente e imersas em solução clorada (200 mg/L de cloro ativo). Em seguida, as vagens foram enxaguadas e as extremidades cortadas manualmente,

com faca de lâmina de inox. O corte foi realizado em fatias de aproximadamente 1 cm de comprimento utilizando processador de alimentos modelo CL 50 e marca Robot Coupe.

Preparo da solução contaminante - Cepas de *E. coli* ATCC 25922 e de *Salmonella* ATCC 13076 mantidas sob refrigeração em tubos contendo ágar nutriente foram semeadas em caldo tripton e incubadas a 37°C por 24 h para ativação. Após esse período estriou-se a *E. coli* em placas com meio de cultura EMB e a *Salmonella* em placas com meio de cultura XLD. Após a incubação, as colônias foram confirmadas por meio de testes bioquímicos. Uma vez confirmada a pureza e a identidade das culturas, as mesmas foram semeadas em tubos inclinados contendo NA e incubadas a 37°C por 48 h para multiplicação da cepa. Após esse período a cultura foi adicionada em erlenmeyer contendo 90 mL de caldo lactosado a 1% e incubada a 37°C por 24 h, quando 7 mL do inóculo foram transferidos para 200 mL de caldo com lactose.

Contaminação das vagens - As vagens minimamente processadas (75 g) foram vertidas nas soluções contaminantes e mantidas por 10 minutos em agitador micro placas (modelo MA 562, Marconi), para assegurar a distribuição dos micro-organismos.

Posteriormente, as vagens foram retiradas das soluções contaminantes com auxílio de uma peneira estéril, acondicionadas em béquer estéril e mantidas em câmara de fluxo laminar por 1 hora para secagem e aderência dos micro-organismos (Santos *et al.*, 2010). Após a secagem, as vagens foram imersas nas soluções sanificantes de dióxido de cloro {solução aquosa estabilizada (50, 100 e 200 mg/L)} e em água destilada, sendo mantidas por 10 minutos em agitador de Micro placas (modelo MA 562, Marconi). Vagens sem imersão foram utilizadas como controle. O produto sanificante utilizado teve o teor de cloro ativo monitorado pelo método iodométrico (Apha, 1998).

Após a imersão em solução de dióxido de cloro, o excesso de solução foi drenado e amostras de vagens foram armazenadas a 10°C por quatro dias, sendo analisadas imediatamente após

aplicação dos tratamentos e aos quatro dias de armazenamento.

Análises microbiológicas - A quantificação de *Salmonella* e *E.coli* foi realizada por plaqueamento em meio seletivo, utilizando-se método adaptado de Sagong *et al.* (2011). O plaqueamento foi realizado a partir de três diluições, utilizando-se triplicata para cada diluição selecionada.

Os resultados expressos em log de Unidades Formadoras de Colônias (log UFC/g) foram submetidos à análise de variância utilizando delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (5 tratamentos e 2 tempos de armazenamento) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Os resultados do dia do processamento foram submetidos à análise de variância, utilizando delineamento inteiramente casualizado e as médias de tratamentos foram comparadas com o controle pelo teste bilateral de Dunnett (5%), de modo a identificar se as reduções decimais (log de UFC da população inicial do tratamento controle – log UFC da população inicial das vagens tratadas) foram significativas. O programa estatístico utilizado foi ASSISTAT.

Efeito do dióxido de cloro sobre o escurecimento enzimático da superfície de corte e a qualidade microbiológica de vagem minimamente processada

Vagens (cultivar Itatiba II) adquiridas em central de abastecimento foram selecionadas quanto à ausência de defeitos. Posteriormente foram resfriadas em câmara fria (10°C por 12 h), lavadas em água corrente para retirada das sujidades. Após essa limpeza, as extremidades das vagens foram cortadas manualmente, com faca de lâmina de inox em fatias de aproximadamente 1 cm de comprimento com auxílio de um processador de alimentos modelo CL 50 e marca Robot Coupe.

As vagens minimamente processadas foram enxaguadas em água destilada para eliminação do suco celular e em seguida imersas por dez minutos nas soluções aquosas estabilizada de dióxido de cloro {solução aquosa estabilizada (50, 100 e 200 mg/L)}. Como controle foi utilizado água destilada.

Após a eliminação do excesso de

água em centrífuga doméstica as vagens foram acondicionadas em bandeja de poliestireno (14 x 20 cm) revestida por filme de PVC 10 µm (aproximadamente 250 g de produto minimamente processado por bandeja) e o armazenamento foi realizado a 10°C, simulando temperatura média das gôndolas de supermercados.

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 tratamentos x 3 tempo de armazenamento) e três repetições. Cada repetição foi composta por uma bandeja contendo vagem minimamente processada.

No dia do processamento, no quarto e sétimo dia de armazenamento, as vagens minimamente processadas foram avaliadas quanto à coloração da superfície de corte, pH e aspectos microbiológicos (contagem de coliformes totais a 45°C; contagem de bactérias psicrotróficas e presença/ausência de *Salmonella*). Amostras de vagens destinadas à determinação de clorofila, carotenoides e às atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase e peroxidase foram congeladas em nitrogênio líquido. A atividade enzimática foi determinada aos 0, 2, 4 e 7 dias de armazenamento.

Análises físico-químicas

a) Coloração da superfície de corte: Para cada repetição (bandeja) foram selecionados ao acaso 30 pedaços de vagem. Em cada pedaço foram realizadas duas leituras, em lados opostos da superfície de corte, totalizando 60 leituras para cada repetição de cada tratamento. As leituras foram realizadas em colorímetro Minolta, modelo CR-400, com resultados expressos em h° (ângulo de cor hue). O h° define a coloração básica, onde 0°= vermelho, 90°= amarelo e 180°= verde (McGuire, 1992). Em estudos preliminares verificou-se que a variável que melhor expressa o escurecimento da superfície de corte da vagem é o ângulo hue (Palharini *et al.*, 2012).

b) pH: O pH do suco homogeneizado de vagem foi medido em pHmetro de bancada, modelo TEC-3MP.

Análises Bioquímicas - As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, mantidas a -80°C por aproximadamente 15 dias, quando foram preparados os extratos enzimáticos para as determi-

nações das atividades enzimáticas, e realizada a extração para as análises de clorofila e carotenoides.

Obtenção do extrato enzimático - Porções de vagem congeladas foram trituradas em moinho, pesadas em quantidade suficiente e homogeneizadas com solução tampão em gral de porcelana. A solução homogênea resultante foi centrifugada em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi coletado, constituindo os extratos enzimáticos, os quais foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas.

a) Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5): Foi realizada conforme metodologia modificada de Peixoto *et al.* (1999). A mistura do extrato com tampão borato e fenilalanina foi incubada a 36°C por 60 minutos. Em seguida foi adicionado solução de ácido clorídrico para parada da reação enzimática e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 290 nm. Os resultados foram expressos em µmoles/min.

b) Polifenoloxidase (EC 1.14.18.1): Foi realizada conforme metodologia adaptada de Cano *et al.* (1997). A mistura do extrato com solução de catecol foi incubada a 30°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionada solução de ácido sulfúrico para parada da reação enzimática e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 395 nm. Os resultados foram expressos em µmoles de catecol transformado/min/g.

c) Peroxidase (EC 1.11.1.7): Foi determinada conforme método adaptado de Lima (1994). A mistura do extrato com solução contendo tampão fosfato de sódio, peróxido de hidrogênio, aminoantipirina e fenol foi incubada a 30°C por 5 minutos. Em seguida adicionou-se álcool etílico absoluto para parada da reação enzimática e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm. Os resultados foram expressos em µMoles de H₂O₂ decomposto/min/g.

Clorofila e Carotenoides - Para os teores de clorofila e carotenoides a extração foi feita utilizando-se o método de Arnon (1949). Os cálculos foram feitos segundo Lichtenthaler (1987). Os teores de clorofila e carotenoides foram expressos em µg por grama de tecido fresco.

Análises microbiológicas - Os mé-

todos empregados nas análises microbiológicas foram descritos por Silva *et al.* (2007). Para a análise de coliformes totais e termotolerantes foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP/g). A análise de presença/ausência de *Salmonella sp* foi conduzida em 25 g da amostra por meio da técnica tradicional. A contagem total de bactérias psicrotróficas foi feita por plaqueamento em superfície em meio PCA.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), exceto os dados das análises microbiológicas que foram apenas comparados com a legislação vigente (RDC nº12 de 02/01/2001). O programa estatístico utilizado foi ASSISTAT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do dióxido de cloro sobre a população de *E. coli* e *Salmonella* inoculadas em vagens minimamente processadas

Imediatamente após a aplicação dos tratamentos observou-se que a população de *E. coli* nas vagens sanificadas foi significativamente inferior em relação aos demais tratamentos, principalmente para as vagens sanificadas com solução clorada nas concentrações de 100 e 200 mg/L (Tabela 1).

Houve redução significativa de *E. coli* nas vagens sanificadas em relação às vagens controle, sendo encontradas 1,35 reduções decimais para as vagens sanificadas com 50 mg/L; 1,80 para aquelas sanificadas com 100 mg/L e 2,06 para as sanificadas com 200 mg/L em relação ao controle (Tabela 1).

Durante o armazenamento a população de *E. coli* das vagens sanificadas continuou sendo reduzida, em cerca de 0,4 redução decimal nas vagens dos tratamentos 50 e 100 mg/L e aproximadamente uma redução decimal nas vagens do tratamento 200 mg/L. Embora o dióxido de cloro não tenha efeito residual, a redução na população de *E. coli* se justifica, pois o excesso de solução sanificante das vagens foi apenas drenado e provavelmente o dióxido de cloro continuou agindo até a secagem total das vagens. Além disso,

Tabela 1. Contagem e número de reduções decimais de *E. coli* ATCC 25922 em vagens minimamente processadas sanificadas com dióxido de cloro (ClO₂) e armazenadas a 10°C [counting and decimal reductions of *E. coli* ATCC 25922 in minimally processed snap bean sanitized with chlorine dioxide (ClO₂) and stored at 10°C]. Bauru, APTA, 2014.

Tratamentos	<i>E. coli</i> (log UFC/g)		Reduções*	
	Dia 0	Dia 4	*1	*2
Controle	6,62 aB	7,64 aA		-1,02 *
H ₂ O	6,36 aA	6,51 bA	0,26 ns	-0,15 ns
ClO ₂ 50 mg/L	5,27 bA	4,83 cB	1,35 *	0,44 *
ClO ₂ 100 mg/L	4,82 cA	4,43 dB	1,80 *	0,39 *
ClO ₂ 200 mg/L	4,56 cA	3,46 eB	2,06 *	1,10 *

Células viáveis da solução contaminante: 7,14 (log UFC/mL) (viable cells of the contaminant solution); Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) (means followed by the same lowercase letters in a column and capital letters on the line do not differ by Tukey test); *1= reduções obtidas no dia 0 (imediatamente após a sanificação) em relação ao controle, sendo que * diferem do controle pelo teste de Dunnet (5%); ns não diferem do controle pelo teste de Dunnet (5%) [*1= reductions obtained on day 0 (immediately after sanitization) compared to control, as follows: * differs from control by Dunnet test (5%); ns do not differ from control by Dunnet test (5%)]; *2= reduções obtidas no dia 4 em relação ao dia 0, sendo * redução significativa pelo teste de Tukey (5%); ns redução não significativa pelo teste de Tukey (5%) [*2= reductions achieved on day 4 compared to day 0, and * significant reduction by the Tukey test (5%); ns not significantly reduced by the Tukey test (5%)].

Tabela 2. Contagem e número de reduções decimais de *Salmonella* ATCC 13076 em vagens minimamente processadas sanificadas com dióxido de cloro (ClO₂) e armazenadas a 10°C (counting and decimal reductions of *Salmonella* ATCC 13076 in minimally processed snap bean sanitized with chlorine dioxide (ClO₂) and stored at 10°C). Bauru, APTA, 2014.

Tratamentos	<i>Salmonella</i> (log UFC/g)		Reduções*	
	Dia 0	Dia 4	*1	*2
Controle	4,85 abB	5,73 aA		-0,88 *
H ₂ O	5,07 aA	5,23 aA	-0,22ns	-0,16 ns
ClO ₂ 50 mg/L	4,77 abA	4,53 bA	0,08ns	0,24 ns
ClO ₂ 100 mg/L	4,31 bcA	3,91 bA	0,54ns	0,40 ns
ClO ₂ 200 mg/L	4,00 cA	3,93 bA	0,85*	0,07 ns

Células viáveis da solução contaminante 5,92 (log UFC/mL) (viable cells of the contaminant solution); Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) (means followed by the same lowercase letters in a column and capital letters on the line do not differ by the Tukey test); *1= reduções obtidas no dia 0 (imediatamente após a sanificação) em relação ao controle, sendo: * diferem do controle pelo teste de Dunnet (5%); ns não diferem do controle pelo teste de Dunnet (5%) [*1 reductions obtained on day 0 (immediately after sanitization) compared to control, as follows: * differs from control by Dunnet test (5%); do not differ from control by Dunnet test (5%)]; *2= reduções obtidas no dia 4 em relação ao dia 0, sendo * diferem do controle pelo teste de Tukey (5%); ns não diferem do controle pelo teste de Tukey (5%) [*2= reductions achieved on day 4 compared to day 0, and * significant reduction by the Tukey test (5%); ns not significantly reduced by the Tukey test (5%)].

a temperatura de armazenamento (10°C) contribuiu para evitar a proliferação destes micro-organismos. Nas vagens controle houve aumento de aproximadamente 1 ciclo log.

Em relação à *Salmonella* observou-se que apenas as vagens sanificadas

com 200 mg/L de dióxido de cloro apresentaram população significativamente inferior em relação ao controle (Tabela 2). A redução da população de *Salmonella* nas vagens deste tratamento em relação ao controle foi de 0,85 ciclo log.

Tabela 3. Contagem de bactérias em vagens minimamente processadas sanificadas com dióxido de cloro (ClO₂) e armazenadas a 10°C, sendo CT= coliformes totais (NMP/g); CTT= coliformes termotolerantes (NMP/g) e BT= bactérias psicrótróficas (log UFC/g) [counting of bacteria in minimally processed snap bean sanitized with chlorine dioxide (ClO₂) and stored at 10°C. CT= total coliforms (NMP/g); CTT= thermotolerant coliforms (NMP/g) and BT= psychrotrophic bacteria (log UFC/g)]. Bauru, APTA, 2014.

Bactérias	Tratamentos	Dias de armazenamento		
		0	4	7
CT	Controle	1,5 x 10 ²	2,7 x 10 ¹	2 x 10 ¹
	ClO ₂ 50 mg/L	2,8 x 10 ¹	1,1 x 10 ¹	1,1 x 10 ¹
	ClO ₂ 100 mg/L	1,5 x 10 ¹	3,5 x 10 ¹	1,1 x 10 ¹
	ClO ₂ 200 mg/L	0,92 x 10 ¹	1,4 x 10 ¹	1,6 x 10 ¹
CTT	Controle	0,74 x 10 ¹	0,3 x 10 ¹	2,4 x 10 ¹
	ClO ₂ 50 mg/L	0,92 x 10 ¹	0,72 x 10 ¹	0,62 x 10 ¹
	ClO ₂ 100 mg/L	<3	<3	0,61 x 10 ¹
	ClO ₂ 200 mg/L	<3	<3	1,6 x 10 ¹
BT	Controle	3,37	5,89	5,99
	ClO ₂ 50 mg/L	3,66	6,40	6,40
	ClO ₂ 100 mg/L	2,99	5,41	5,75
	ClO ₂ 200 mg/L	2,96	5,49	6,40

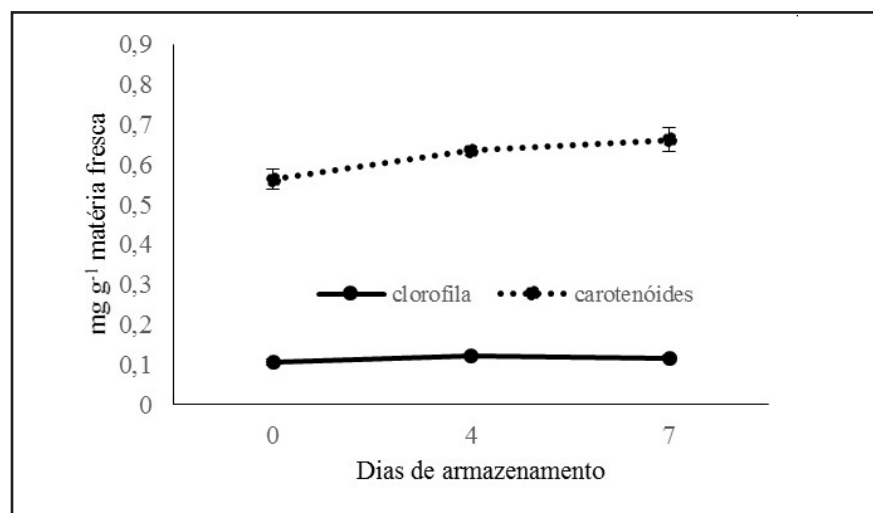


Figura 1. Teor de clorofila total e carotenóides em vagem minimamente processada sanitizada com dióxido de cloro (ClO₂) e armazenadas a 10°C. Os valores representam a média dos tratamentos em cada dia de avaliação. As barras verticais representam o desvio padrão da média {total chlorophyll and carotenoids in minimally processed snap bean sanitized with chlorine dioxide (ClO₂) and stored at 10°C. Values represent the mean of treatments. Vertical bars represent standard deviation}. Bauru, APTA, 2014.

No quarto dia de armazenamento observou-se aumento significativo da população de *Salmonella* nas vagens controle, as quais diferiram das vagens sanitizadas com as soluções cloradas de 50, 100 e 200 mg/L (Tabela 2).

O dióxido de cloro é considerado um forte agente oxidante e tem a capacidade de atacar a membrana celular dos micro-organismos, alterando a sua permeabi-

lidade e levando à desidratação celular (Srebernich, 2007). Também atua sobre a inibição da síntese proteica, o que paralisa o crescimento do patógeno (Wu & Kim, 2007).

De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que a *Salmonella* é mais resistente que a *E. coli* à sanificação com dióxido de cloro em vagens. Resultados similares foram encontrados em alface

(Mahmoud & Linton, 2008) e morangos (Mahmoud *et al.*, 2007) tratados com gás dióxido de cloro.

Efeito do dióxido de cloro sobre o escurecimento enzimático da superfície de corte e a qualidade microbiológica de vagem minimamente processada

Coloração da superfície de corte - As vagens tratadas apresentaram escurecimento da superfície de corte ao longo do tempo de armazenamento, para todas as concentrações, evidenciado pela redução significativa do ângulo de cor (h°). No dia do processamento o h° era de 115,87, atingindo 110,35 no quarto dia de armazenamento e, 108,11 no sétimo dia de armazenamento.

O dióxido de cloro não minimizou o escurecimento da superfície de corte das vagens, fato esse contrário ao observado por outros autores em outras hortaliças. Chen *et al.* (2010) relataram que o dióxido de cloro retardou o escurecimento de alface minimamente processada armazenada a 4°C, assim como Du *et al.* (2009), que constataram menor escurecimento de raízes de lótus tratadas com dióxido de cloro e armazenadas a 4°C. Estas diferenças podem estar relacionadas com o material vegetal (genótipo), principalmente com o tipo de compostos fenólicos existente, os quais podem ser oxidados por múltiplos processos.

O mecanismo de ação do dióxido de cloro em minimizar reações do escurecimento ainda não está totalmente esclarecido. De acordo com Navalon *et al.* (2009), o dióxido de cloro pode degradar aminoácidos em substâncias simples. Nesse sentido Chen *et al.* (2010) inferiram que o dióxido de cloro pode atacar aminoácidos essenciais para atividade das enzimas envolvidas nas reações de escurecimento e gerar mudanças em sua estrutura.

Clorofila total e carotenóides - Os tratamentos com dióxido de cloro em diferentes concentrações não alteraram de forma significativa o teor de clorofila total e nem o teor de carotenóides das vagens minimamente processadas. Apenas houve aumento de 9,35% do teor de clorofila e de 17,60% do teor de carotenóides ao final do armazenamento (Figura 1).

Embora o aumento no teor de clo-

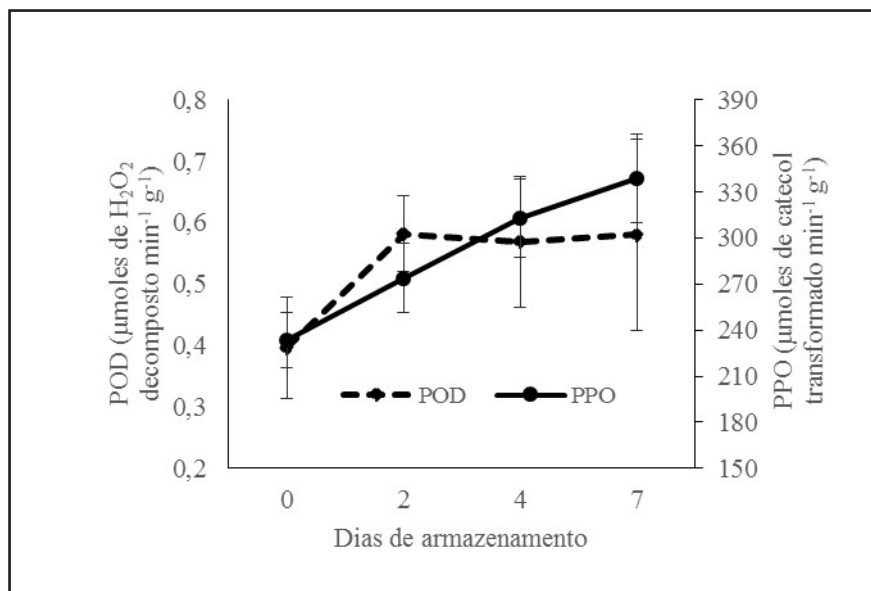


Figura 2. Atividade da enzima peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em vagem minimamente processada sanitizadas com dióxido de cloro (ClO_2) e armazenadas a 10°C . Os valores representam a média dos tratamentos em cada dia de avaliação. As barras verticais representam o desvio padrão da média {polyphenoloxidase and peroxidase activity in minimally processed snap bean sanitized with chlorine dioxide (ClO_2) and stored at 10°C . Values represent the mean of treatments. Vertical bars represent standard deviation}. Bauru, APTA, 2014.

rofila tenha sido significativo ($p < 0,05$) a variação foi muito pequena, de $0,107 \text{ mg/g}$ no dia do processamento para $0,117 \text{ mg/g}$ de matéria fresca no sétimo dia de armazenamento. Trail *et al.* (1992) também verificaram que vagens armazenadas a 10°C apresentaram aumento no conteúdo de clorofila após quatro dias de armazenamento, seguido de degradação até o 16º dia de armazenamento.

O maior teor de carotenoides ao final do armazenamento pode estar relacionado à perda de massa das vagens, o que resulta na concentração destes compostos. Estudos também indicam que a biodisponibilidade dos carotenoides pode ser afetada pela forma isomérica. Os carotenoides estão presentes predominantemente na natureza na forma trans, os isômeros cis aparecem em concentrações bem menores, ocorrendo um aumento durante o processamento e estocagem (Kobori *et al.*, 2010).

Atividade enzimática - A atividade da PAL não foi afetada pelos tratamentos com dióxido de cloro e nem pelo tempo de armazenamento, mantendo-se baixa, com valores ao redor de $0,01 \text{ μmoles/min}$.

As atividades das enzimas POD e

PPO não foram afetadas pelos tratamentos, apenas pelo tempo de armazenamento. Em relação à POD os valores foram baixos, sendo menores que 1 μmol e houve aumento da atividade no segundo dia de armazenamento. Após esse período a atividade manteve-se constante (Figura 2).

A atividade da PPO obteve valores acima de 200 μmoles , havendo aumento gradativo em função do armazenamento (Figura 2).

O aumento das atividades das enzimas POD e PPO indica que os substratos fenólicos estão sendo consumidos, o que ocasiona o escurecimento enzimático. A PPO catalisa duas reações envolvendo o oxigênio: hidroxilação de monofenóis a orto-difenóis e oxidação de orto-defenóis a orto-quinonas (Gomes *et al.*, 2001) enquanto a POD catalisa a oxidação de compostos fenólicos a quinonas em presença de peróxido de hidrogênio (Dunford & Stillman, 1976). No trabalho em estudo, o escurecimento foi significativo a partir do quarto dia de armazenamento, momento em que o h° atingiu $110,35$ (Tabela 3). Peres *et al.* (2011) relatam que a aparência geral das vagens minimamente processadas foi aceita até o valor de h° alcançar

aproximadamente 108.

pH - Os tratamentos com dióxido de cloro não afetaram o pH das vagens. Houve apenas efeito do tempo de armazenamento; o valor médio de pH aumentou de 6,1 no dia do processamento para 6,4 no sétimo dia de armazenamento.

Gómez Lopes *et al.* (2008) e Jacxsens *et al.* (2003) também observaram aumento do pH durante o armazenamento de alface minimamente processada. De acordo com Jacxsens *et al.* (2003), o aumento de pH é típico para os vegetais em que os micro-organismos Gram negativos desempenham papel importante na deterioração, e que pode resultar da quebra de proteínas com a liberação de compostos básicos.

Análises microbiológicas - A eficácia dos tratamentos com dióxido de cloro em reduzir a contagem de bactérias psicrotróficas foi observada após os tratamentos (dia 0) nas vagens tratadas com 100 e 200 mg/L. No entanto, a redução foi menor que 0,5 ciclo log. No quarto dia de armazenamento observou-se aumento, cerca de 2,5 ciclos log, em todos os tratamentos, atingindo contagens ao redor de 6 log UFC/g. Posteriormente as bactérias das vagens controle e 50 mg/L provavelmente entraram em fase estacionária. Houve aumento apenas nas vagens tratadas com 100 e 200 mg/L (Tabela 3).

Gómez Lopes *et al.* (2008) estudaram o efeito do gás dióxido de cloro na conservação de alface minimamente processada. Apesar de redução microbiológica inicial devido ao tratamento, a contagem de bactérias psicrotróficas nas amostras tratadas com gás dióxido de cloro atingiram níveis mais elevados do que as amostras não tratadas, no terceiro dia de armazenamento a 7°C , resultados estes similares aos encontrados no presente trabalho.

Como a legislação não apresenta padrões para a contagem de bactérias psicrotróficas em vegetais minimamente processados utilizou-se como base a recomendação de Morton (2001) para contagem de bactéria aeróbias mesófilas em vegetais congelados e similares, que indica o máximo de contagem 5-6 log UFC/g.

As sanificações nas concentrações de 100 e 200 mg/L foram eficazes em

controlar coliformes termotolerantes, sendo que esses micro-organismos foram detectados apenas no último dia de armazenamento, porém em níveis inferiores ao limite estabelecido pela legislação. ARDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001, da ANVISA preconiza limite máximo de 10^2 NMP/g para coliformes termotolerantes em hortaliças minimamente processadas (Brasil, 2001).

Em relação aos coliformes totais observou-se que, conforme houve aumento na concentração de dióxido de cloro aplicada, menor foi a população destes micro-organismos (Tabela 3), o que evidencia a importância da operação de sanificação. Durante o armazenamento a população de coliformes apresentou pequena oscilação, porém, houve redução considerável nas vagens controle, a qual pode ser explicada pela possível existência de lactobacilos que produzem o ácido láctico, inibindo o desenvolvimento dos coliformes.

Segundo Jay (2005), os lactobacilos são encontrados em todos ou quase em todos os vegetais junto com outras bactérias produtoras de ácido láctico.

Apesar da legislação não contemplar os coliformes totais, a população destes micro-organismos nas vagens sanificadas ficou abaixo do padrão estabelecido para coliformes termotolerantes.

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectado *Salmonella*, atendendo a RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001, da ANVISA que preconiza para hortaliças minimamente processadas ausência de *Salmonella* em 25 g de produtos (Brasil, 2001).

As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal do homem e de animais o principal reservatório natural. Sendo assim, a ausência de *Salmonella* na vagem minimamente processada é reflexo da ótima qualidade da matéria-prima utilizada e da adoção das boas práticas de fabricação.

O dióxido de cloro não foi eficaz em minimizar o escurecimento da superfície de corte das vagens minimamente processadas, mas contribuiu significativamente para a redução da população microbiana, sendo indicada a sanificação com 200 mg/L e tempo de imersão de 10 minutos. Neste trabalho a sanificação foi

realizada somente após o corte, conforme fluxograma recomendado por Peres *et al.* (2011). Estudos estão sendo realizados para verificar em qual(is) etapa(s) a sanificação é realmente necessária de modo a garantir um produto seguro do ponto de vista microbiológico.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Processo 2011/08421-0) pelo auxílio financeiro. Ao CNPq pela Bolsa DT (Processo 310396/2011-5).

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1998. *Standard Methods*, 20 ed. Method 4500-CLO₂-B.
- ARNON DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- ARTÉS F; GÓMEZ P; AGUAYO E; ESCALONA V; ARTÉS-HERNÁNDEZ F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology* 51: 287-296.
- ARTÉS F; GÓMEZ PA; ARTÉS-HERNÁNDEZ F. 2007. Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. *Food Science Technology International* 13: 177-188.
- BRASIL. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 de jan. 2001.
- BRECHT JK; SALTVEIT ME; TALCOTT ST; MORETTI CL. 2007. Alterações metabólicas. In: MORETTI CL (Ed). *Manual de Processamento de Frutas e Hortaliças*. Brasília: Embrapa Hortaliças e SEBRAE, cap.2. p.43-99.
- CANO MP; ANCOS OB; MATA LLANA MC; CÁMARA M; REGLERO G; TABERA J. 1997. Differences among spanish and latin-american banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. *Food Chemistry* 59: 411-419.
- CEAGESP. *Análises e estatísticas da comercialização na rede de entrepostos 2013*. São Paulo: Sedes, 2014.
- CHEN Z; ZHU C; ZHANG Y; NIU D; DU J. 2010. Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on enzymatic browning and shelf-life of fresh-cut asparagus lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biology and Technology* 58: 232-238.
- DU J; FU Y; WANG N. 2009. Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on browning of fresh-cut lotus root. *LWT- Food Science and Technology* 42: 654-659.
- DUNFORD HB; STILLMAN JS. 1976. On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews* 19: 187-251.
- GOMES MRA; OLIVEIRA MGA; ALMEIDA A; CARNEIRO GES; BARROS EG; MOREIRA M.A. 2001. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21: 69-72.
- GÓMEZ-LÓPEZ VM; RAGAERT P; JEYACHCHANDRAN V; DEBEVERE J; DEVECEGHERE F. 2008. Shelf-life of minimally processed lettuce and cabbage treated with gaseous chlorine dioxide and cysteine. *International Journal of Food Microbiology* 121: 74-83.
- JACXSSENS L; DEVLIEGHERE F; RAGAERT P; VANNESTE E; DEBEVERE J. 2003. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology* 83: 263-280.
- JAY JM. 2005. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Editora Artmed, 711p.
- KOBORI CN; HUBER LS; KIMURA M; RODRIGUEZ-AMAYA DB. 2010. Teores de carotenoides em produtos de tomate. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 69:78-83
- LICHTENTHALER HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick, SP. Kaplan NO (eds). *Methods in enzymology* 148: 350-382.
- LIMA GPP. 1994. Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase do nitrato em calos de arroz (Oriza sativa cv. IAC 4440). Botucatu: UNESP, 85p. (Tese doutorado).
- MAHMOUD BSM; BHAGAT AR; LINTON RH. 2007. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* on strawberries by chlorine dioxide gas. *Food Microbiology* 24: 736-744.
- MAHMOUD BSM; LINTON RH. 2008. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on lettuce by chlorine dioxide gas. *Food Microbiology* 25: 244-252.
- McGUIRRE RG. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27: 1254-1255.
- MORTON RD. 2001. Aerobic plate count. In: DOWNES FP; ITO K (eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. Washington: American Public Health Association. p. 63-67.
- NAVALON S; ALVARO M; GARCIA H. 2009. Chlorine dioxide reaction with selected amino acids in water. *Journal of Hazardous Materials* 164: 1089-1097.
- PALHARINI MCA; SIMIONATO EMRS; FILETI MS; SANTOS CAJP. 2012. Metodologia para avaliação do escurecimento de vagem minimamente processada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XXIII. Resumos...Campinas: SBCTA (CD-ROM).
- PEIXOTO PHP; CAMBRAIA J; SANT'ANNA R; MOSQUIM PR; MOREIRA MA. 1999. Aluminium effects on lipid peroxidation

- and the actives of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11: 137-143.
- PERES JE; ARRUDAMC; FILETIMS; FISCHER IH; SIMIONATO EMRS; VOLTAN DS. 2011. Qualidade de feijão-vagem minimamente processado em função das operações de enxague e sanificação. *Semina* 32: 173-180, 2011.
- SAENGNIL K; CHUMYAM A; FAIYUE B; UTHAIBUTRA J. 2014. Use of chlorine dioxide fumigation to alleviate enzymatic browning of harvested 'Daw' longan pericarp during storage under ambient conditions. *Postharvest Biology and Technology* 91: 49-56.
- SAGONG HG; LEE SY; CHANG PS; HEU S; RYU S; CHOI YJ; KANG DH. 2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 145: 287-292.
- SANTOS YO; ALMEIDA RCC; GUIMARÃES AG; ALMEIDA PF. 2010. Hygienic-sanitary quality of vegetables and evaluation of treatments for the elimination of indigenous *E. coli* and *E. coli* O157:H7 from the surface of leaves of lettuce (*Lactuca sativa*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30: 1083-1089.
- SILVA N; JUNQUEIRA VCA; SILVEIRA NFA; TANIWAKI MH; SANTOS RFS; GOMES RAR. 2007. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela. 536p.
- SREBERNICH S.M. 2007 Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanificação do cheiro-verde minimamente processado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27: 744-750.
- TOMÁS-CALLEJAS A; LÓPEZ-GÁLVEZ F; SBODIO A; ARTÉS F; ARTÉS-HERNÁNDEZ F; SUSLOW TV. 2012. Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella croos*-contamination on fresh-cut Red chard. *Food Control* 23: 325-332.
- TRAIL MA; WAHEM IA; BIZRI JN. 1992. Snap bean quality changed minimally when stored in low density polyolefin film package. *Journal of Food Science* 57: 977-979.
- WU VCH; KIM B. 2007. Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeasts and molds on blueberries. *Food Microbiology*, 24: 794-800.
-