

## Área: Tecnologia de Alimentos

# EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, ENTEROBACTÉRIAS E BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM ALFACE (*LACTUCA SATIVA*) VARIEDADE CRISPA

**Ivan De Marco, Liziane Schittler, Josiane Kilian, Cristine Vogel, Elisa Sonza\***

*Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Pinhalzinho – SC/Brasil.*

*\*E-mail: elisasonza@edu.sc.senai.br*

**RESUMO** – A alface é rica em minerais e vitaminas, sendo a folhosa mais consumida no país. As hortaliças, em especial a alface, por não passarem por tratamento térmico, são passíveis de contaminação microbiana. A higienização correta desta hortaliça é uma maneira de garantir a inocuidade deste alimento. Este estudo, teve como objetivo avaliar o efeito do hipoclorito de sódio 2,5% e das temperaturas de 2°C e 8°C de armazenamento sobre os micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface (*Lactuca sativa*) variedade crispa. Para isso, alfaces foram submetidas a imersão em hipoclorito de sódio por 30 segundos, embaladas e armazenadas em temperaturas de 2°C e 8°C, por 15 e seis dias, respectivamente. Nos tempos zero, logo após a sanitização, cinco, 10 e 15 dias e nos tempos zero, três e seis dias de armazenamento a 2°C e a 8°C, respectivamente, as alfaces foram submetidas as análises microbiológicas de contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL. Houve diferença significativa (<0,05) entre as contagens dos micro-organismos em alface sem sanitização e sanitizada com hipoclorito de sódio. As contagens dos micro-organismos avaliados foram maiores quando as alfaces foram armazenadas a 8°C do que quando armazenadas a 2°C, exceto as BAL que as contagens se mantiveram constantes nas duas temperaturas de armazenamento. O hipoclorito de sódio 2,5% reduziu a carga microbiana de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface (*Lactuca sativa*) variedade crispa. Além disso, a temperatura de armazenamento deste produto pode influenciar no desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos e enterobactérias.

**Palavras-chave:** Hortaliças; Atividade Microbiológica; Vida Útil; Sanitização.

## 1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil e no mundo. Os hábitos alimentares da população evidenciam essa condição pela importância desta hortaliça em uma dieta equilibrada e saudável. A alface é rica em minerais como principalmente o cálcio bem como fonte de vitaminas A, B1, B2 e C, além de possuir baixo valor calórico (OLIVEIRA et al., 2006).

Contudo, a presença de micro-organismos patogênicos na alface é comumente encontrada e pode oferecer riscos à saúde do consumidor, pois causam distúrbios gastrointestinais além de outras doenças mais graves. A presença desses agentes infecciosos nos alimentos pode estar relacionada com o cultivo, colheita, armazenamento e transporte (PEREIRA; BEZERRA, 2017).

A lavagem dos vegetais é uma prática bastante comum, no entanto não garante a segurança deste alimento. Para torná-lo seguro, se faz necessário a etapa de sanitização, que consiste em reduzir micro-organismos críticos para saúde pública em níveis considerados seguros. Um dos sanitizantes mais comuns utilizados em alimentos é a água sanitária, formulada à base de hipoclorito de sódio, que apresentam teor de cloro ativo entre 2,0 a 2,5% (BRASIL, 2009). Dentre as vantagens na utilização deste sanitizante está o fácil acesso, baixo custo e solubilidade em água. O hipoclorito de sódio atua como biocidas de amplo espectro, que reagem com as proteínas da membrana das células microbianas, interferindo no transporte de nutrientes e promovendo a perda de componentes celulares (VANETTI, 2000).

Além das etapas de lavagem e sanitização, o uso de refrigeração, quando bem aplicado, é um dos meios mais eficazes na manutenção da qualidade e extensão do período de comercialização de hortaliças folhosas, cuja função é retardar os processos metabólicos, porém sem ocasionar distúrbios fisiológicos (CORTEZ, et. al. 2002).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo o estudo do efeito do hipoclorito de sódio 2,5% na sanitização da alface *Lactuca sativa* variedade crispa, com relação a qualidade microbiológica e sua implicação na vida útil em diferentes temperaturas de armazenamento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da UDESC.

A alface (*Lactuca sativa*), variedade crispa foi gentilmente doada pela agroindústria Scussel Verduras de Chapecó/SC. O sanitizante, hipoclorito de sódio (Q-Boa), foi adquirido no comércio local de Pinhalzinho/SC.

### 2.1 Preparo da amostra

As alfaces sofreram toailete manual, as folhas sem danificação foram selecionadas, separadas do talo e lavadas em água corrente. A sanitização foi realizada através da imersão das alfaces em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), por 30 segundos. Após, realizou-se o enxágue em água potável, centrifugadas e acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD) com aproximadamente 100g. Para avaliar o efeito da etapa de sanitização sobre a microbiota de alface, reservou uma amostra de alface que passou somente pela etapa de lavagem. As alfaces foram armazenadas em temperaturas 2°C e 8°C, por 15 e 6 dias, respectivamente. Nos tempos zero, cinco, dez e quinze dias de armazenamento a 2°C e nos tempos zero, três e seis dias de armazenamento, as alfaces foram submetidas as análises microbiológicas de contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL. O experimento foi realizado em triplicata.

## 2.2 Análise microbiológica

Foram transferidas, assepticamente, 25g de amostra de cada temperatura de armazenamento, para sacos plásticos esterilizados tipo *stomacher*, e adicionou-se 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%. (p/v), perfazendo a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta diluição, preparou-se as demais diluições seriadas.

Para as contagens de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, utilizou-se método descrito pela ISO 4833:2013 e APHA: 2015, respectivamente. Alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas na superfície das placas de Petri de ágar Plate Count Agar (PCA/Oxoid), as quais foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 horas e 10 dias, respectivamente. As placas que apresentaram colônias foram contadas e o resultado foi expresso em log UFC.g<sup>-1</sup>.

As contagens de enterobactérias e bactérias ácido lácticas (BAL) foram realizadas de acordo com ISO 21528-2:2017 e ISO 15214: 1998, respectivamente. Foram inoculadas em profundidade 1mL das diluições selecionadas em placas de Petri e adicionou-se o ágar Violet Red Bile Glucose (VRBG/Oxoid) e ágar Man, Rogosa and Sharpe (MRS/Oxoid), as quais foram incubadas  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  e  $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ , respectivamente. As placas que apresentaram colônias foram contadas e o resultado foi expresso em log UFC.g<sup>-1</sup>.

## 2.3 Análise estatística

As contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface durante as temperaturas de armazenamento de  $2^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$  foram submetidas a análise estatística Tukey com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,050$ ) utilizando software *Statistica* versão 10.0.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 pode-se visualizar as médias das contagens de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface sem sanitização e sanitizada com hipoclorito de sódio 2,5%, armazenadas nas temperaturas de  $2^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$  por 15 e 6 dias, respectivamente. Observa-se (Tabela 1), que houve diferença estatística ( $p > 0,05\%$ ) nas médias das contagens dos micro-organismos avaliados em relação as alfaces sem sanitização e sanitizada. Este resultado demonstra que a sanitização é uma etapa importante na redução da carga microbiana. De acordo com Jiang et. al (2017), a sanitização é uma etapa importante em vegetais folhosos, proporcionando a segurança destes alimentos, haja vista que os mesmos não passam por tratamentos térmicos para redução da carga microbiana.

Tabela 1: Médias das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, enterobactérias e BAL (log UFC<sup>-1</sup>) em alface com e sem o uso de sanitizante e armazenamento à 2°C e 8°C

	Tempo (dias)	Contagem (log UFC.g <sup>-1</sup> )			
		Mesófilos	Psicrotróficos	Enterobactérias	BAL
Temperatura 2°C	Sem sanitização	4,76 ± 0,045 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,065 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,137 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,011 <sup>a</sup>
	0	2,65 ± 0,048 <sup>b</sup>	2,74 ± 0,039 <sup>b</sup>	2,38 ± 0,265 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>b</sup>
	5	3,04 ± 0,040 <sup>cb</sup>	3,02 ± 0,020 <sup>cd</sup>	1,74 ± 0,040 <sup>c</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>b</sup>
	10	3,06 ± 0,057 <sup>dc</sup>	3,13 ± 0,048 <sup>dc</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>b</sup>
	15	3,47 ± 0,029 <sup>e</sup>	3,59 ± 0,044 <sup>e</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>b</sup>
Temperatura 8°C	Sem sanitização	4,76 ± 0,045 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,065 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,137 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,011 <sup>a</sup>
	0	2,74 ± 0,040 <sup>b</sup>	2,39 ± 0,088 <sup>b</sup>	1,65 ± 0,048 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>b</sup>
	3	3,14 ± 0,063 <sup>c</sup>	3,37 ± 0,118 <sup>c</sup>	2,39 ± 0,177 <sup>c</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>b</sup>
	6	3,57 ± 0,035 <sup>d</sup>	3,83 ± 0,112 <sup>d</sup>	2,85 ± 0,146 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,001 <sup>b</sup>

\*Médias com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Do autor, 2018.

Percebe-se na Tabela 1 que quando as alfaces foram sanitizadas e armazenadas a 2°C, houve aumento de 0,82 e 0,85 log UFC.g<sup>-1</sup> nas contagens de micro-organismo mesófilos e psicrotróficos entre os tempos zero (logo após a sanitização) e 15 dias de armazenamento, respectivamente. Já, a média das contagens de mesófilos e psicrotróficos em alfaces sanitizadas aumentaram de 0,83 e 1,44 log UFC.g<sup>-1</sup>, durante os seis dias de armazenamento a 8°C, respectivamente. Este resultado demonstra que a temperatura influencia diretamente no crescimento destes micro-organismos, principalmente os psicrotróficos.

Já resultados inferiores foram relatados por Waghmare e Annapure (2015), onde verificaram aumento de 0,4 log UFC/g<sup>-1</sup> na contagem de mesófilos em coentro sanitizado com 2,0% de hipoclorito de sódio e armazenado a 5°C, por 15 dias. Esta diferença entre os resultados encontrados nesta pesquisa pode estar relacionado aos componentes contidos no coentro.

Resultados superiores foram relatados por Bachelli (2010), onde obtiveram aumento de 2,38 log UFC.g<sup>-1</sup> na contagem de psicrotrófico em alface minimamente processada e sanitizada com hipoclorito de sódio 2%, armazenada a 2°C por 12 dias.

Apesar da legislação brasileira não estabelecer limites para micro-organismos aeróbios presentes nos alimentos, estes estão integralmente relacionados com a contaminação dos produtos durante as etapas de processamento. Dentro do grupo dos aeróbios, os que merecem atenção são os psicrotróficos, pois são micro-organismos que conseguem multiplicar-se em temperaturas de 0°C a 7°C, o que faz destes, os principais responsáveis pela diminuição da vida útil de alimentos refrigerados (APHA, 2001).

Segundo Food Safety Whatch (2009), o armazenamento abaixo de 8°C irá impedir o crescimento da maioria dos agentes patogênicos de origem alimentar, com as notáveis exceções de *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, que são bactérias psicrotróficas. Temperaturas de refrigeração irão reduzir a taxa de crescimento adicional ajudando a prolongar a vida útil do produto.

Nas análises de enterobactérias (Tabela 1) pode-se observar que houve redução de 1,38 log UFC.g<sup>-1</sup> na contagem em alface sanitizada com hipoclorito de sódio 2,5%, durante o armazenamento a 2°C. No entanto, quando a alface sanitizada foi armazenada a 8°C, houve aumento de 1,20 UFC.g<sup>-1</sup> nas contagens de enterobactérias durante os seis dias de armazenamento. Este resultado demonstra que a temperatura de armazenamento influencia diretamente no desenvolvimento de enterobactérias. De acordo com Gil et al. (2009), o uso de sanitizantes pode reduzir as *Enterobacteriaceae*, porém não elimina totalmente estes micro-organismos.

Já a média das contagens de BAL em alface se mantiveram constantes após a sanitização com hipoclorito de sódio 2,5% durante o armazenamento a 2°C e 8°C, por 15 e seis dias, respectivamente. Não houve diferença significativa (p<0,05) entre as médias das contagens de BAL em alface sanitizada entre os tempos de armazenamento.

Resultados semelhantes foram relatados por Lopes-Galvez et al. (2013) e Gomez-Lopez et al. (2008), onde não verificaram o crescimento de BAL em alface minimamente processada e armazenada em temperatura de refrigeração.

#### 4. CONCLUSÃO

O hipoclorito de sódio 2,5% reduziu a carga microbiana de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias e BAL em alface (*Lactuca sativa*) variedade crispa. Além disso, a temperatura de armazenamento deste produto, pode influenciar no crescimento de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos e enterobactérias.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/Pinhalzinho bem como da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina - FAPESC.

#### 6 REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 676p, 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 5 ed. Whashington: APHA, 2015.

BACHELLI, Mara Ligia Biazotto et al. **Sanitização para alface minimamente processada em comparação ao hipoclorito de sódio**. 2010. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola. Campinas, SP.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 55, de 10 de novembro de 2009. Aprova Regulamento Técnico que estabelece os requisitos mínimos para o registro de produtos saneantes categorizados como água sanitária e alvejantes à base de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 13 nov 2009, Seção 1, p. 42-43.

CORTEZ, L. A. B et al. Importância do resfriamento para frutas e hortaliças no Brasil. **Resfriamento de frutas e hortaliças**. Brasília, 2002. V. 1, p. 16-31.

FOOD SAFETY WHATCH. Salad days – an investigation into the microbiological safety of prepared salads. 27 de February de 2009.

GIL, M. I. et al. Pre-and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 4, p. 453-468, 2015.

GOMEZ-LOPEZ, V.M. et al. Prazo de validade de alface e repolho minimamente processados tratados com dióxido de cloro gasoso e cisteína. **Internacional. Journal of Food Microbiology**, 121, p. 74 – 83, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION -**ISO 15214:1998** – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C. Switzerland, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION -**ISO 21528-2:2017** - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method. Switzerland, 2017. 15 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION -**ISO 4833-1:2013** - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C. Switzerland, 2013. 9 p.

LOPEZ-GALVEZ, et al. Effect of new sanitizing formulations on quality of fresh-cut iceberg lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, 85, 102–108, 2013.

MORAES, I. V. M. Cultivo de hortaliças. **Dossiê Técnico. Rio de Janeiro: Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**, 2006.

OLIVEIRA, M. de L. S. et al. Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.) e tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.143, p.96-101, ago. 2006.

PEREIRA, A. T. S.; BEZZARA, C. C. **Avaliação Microbiológica da *Lactuca sativa* (Alface) Comercializada nas Feiras da Cidade de Parintins-AM**. 2017. 17f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade do estado do Amazonas, Parintins, 2017.

VANETTI, M.C.D. **Controle Microbiológico e Higiene no Processamento mínimo**. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, 2., 2000. Viçosa. Palestras... Viçosa: UFV, 2000. P.44-51.

WAGHMARE, R. B.; ANNAPURE, U. S. Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 3, p. 62-69, 2015.