DENISE LUTGENS RIZZO

Alface orgânica – avaliação microbiológica relacionada ao sistema de produção e processamento mínimo e estudo de sua aceitação sensorial

"Versão corrigida"

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração em Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Trindade

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

R627a

Rizzo, Denise Lutgens
Alface orgânica – avaliação microbiológica relacionada ao sistema de produção e processamento mínimo e estudo de sua aceitação sensorial / Denise Lutgens Rizzo. -- Pirassununga, 2014.
149 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciência da Engenharia de Alimentos
Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Trindade.

1. Qualidade 2. Sanitização 3. Intenção de compra 4. Esponjeamento. I. Título.

Dedico a Deus e às pessoas que
me fizeram ser o que sou:

À família, aos amigos, professores e produtores rurais.

Agradecimentos:

Agradeço aos mestres que busquei e encontrei na FZEA/USP;

Ao Instituto EMATER que permitiu meu crescimento profissional; especialmente a Mauricio Castro Alves;

A APO - Associação dos Produtores Orgânicos de Ribeirão Claro, sem o esforço de produção orgânica, meu trabalho não teria sentido;

Especial agradecimento a Cynthia Ditchfield, amiga e companheira, que me incentivou a vir para Pirassununga e cedeu sua casa, junto com seu esposo, Cassio Minghini Quirino dos Santos;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marco Antonio Trindade, Prof. Dr. Judite Lapa Guimarães, Prof. Dr. Marta Mitsui Kushida pelos valiosos ensinamentos, confiança, dedicação, paciência e constantes incentivos que muito enriqueceram e tornaram possível a realização deste trabalho;

Ao meu primeiro orientador Prof. Dr. José Otávio Machado Menten que me ensinou a ver as coisas de modo mais positivo;

A Mayra Monteiro Viana que me inspirou com seus trabalhos;

A Luciana Batista e Camilla Uoda Chinone que trabalharam nas análises microbiológicas, obrigada pela dedicação e companheirismo;

A Mariana, Beatriz, Kátia, Juliana, Thais, Paulo por todo o trabalho na análise sensorial; sem o qual seria impossível concluir os resultados;

A Luis Hiroshi Shimizu, desde o princípio na iniciativa orgânica de Ribeirão Claro;

A André Augusto de Carli pela arte dos rótulos de alface e trabalho conjunto na pesquisa junto a consumidores;

A Rodrigo Lourenço pelas maravilhosas imagens no MEV;

A Vitor Augusto Garcia pela orientação em várias planilhas estatísticas;

A Ivo Melão Barreto pelo apoio em minhas pesquisas, junto a consumidores de orgânicos;

Aos colegas da pós-graduação com os quais convivi, sempre com verdadeiro interesse e muito companheirismo;

Aos funcionários da biblioteca pela atenção e disposição;

Aos técnicos de laboratório Guilherme, Marcelo, Nilson, pelo respeito, auxílio e amizade.

Enfim, agradeço a Deus pela vida, por todos os desafios superados e por mais este avanço em minha carreira profissional!

- Vocês são o sal para a humanidade; mas, se o sal perde o gosto, deixa de ser sal e não serve para mais nada. É jogado fora e pisado pelas pessoas que passam.

- Vocês são a luz para o mundo. Não se pode esconder uma cidade construída sobre um monte. Ninguém acende uma lamparina para colocá-la debaixo de um cesto. Pelo contrário, ela é colocada no lugar próprio para que ilumine todos os que estão na casa. Assim também a luz de vocês deve brilhar para que os outros vejam as coisas boas que vocês fazem e louvem o Pai de vocês, que está no céu.

Mateus 5, 13-16

RESUMO GERAL

RIZZO, D. L. **Alface orgânica – avaliação microbiológica relacionada ao sistema de produção e processamento mínimo e estudo de sua aceitação sensorial.** 2014. 149f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Hortaliças são identificadas como veículos de patógenos, especialmente *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* e surtos recentes revelam crescente número de casos associados a seu consumo. A sanitização pode evitar contaminações, mas não atinge patógenos internalizados na planta e, além disso, pode não ter efeito ao longo da vida útil do produto. Amostrar superfícies pode ampliar a amostragem, especialmente para patógenos humanos de comportamento errático. Após sanitização, perda de qualidade sensorial e uso de produtos químicos podem ser fatores de rejeição de produto por parte do consumidor de orgânicos. Foram objetivos: 1 – Quantificar a microbiota presente sobre folhas de alface antes da colheita, 2 - Rastrear possíveis pontos de contaminação nas propriedades rurais, 3 - Avaliar o efeito da sanitização de alface em sua qualidade microbiológica e sensorial, 4 - Verificar o impacto do preço, conveniência e presença de selo de certificação orgânica sobre a intenção de compra de alface. Para coleta de microrganismos de folhas, mãos, caixas, bancadas e utensílios que entram em contato com a produção, em 10 propriedades rurais, esponjas de celulose embebidas em água peptonada tamponada foram utilizadas para recuperar microrganismos. Análises sensoriais e microbiológicas foram realizadas durante o período de armazenamento de alfaces refrigeradas a 8ºC, até 9 dias após colheita, comparando os seguintes procedimentos: 1 – Lavagem com água da rede e sanitização com dicloroisocianurato de sódio dihidratado; 2 – Lavagem com água da rede e sanitização com oxicloreto de cálcio; 3 – Lavagem em água da rede, sem sanitização; e 4 – Sem lavagem e sem sanitização. As

técnicas sensoriais utilizadas para verificar aspectos de aceitação do produto pelo consumidor e explorar seu comportamento de compra foram: *Conjoint Analysis*, associação de palavras, escala de atitude orgânica. Duas pesquisas foram realizadas, sendo uma presencial com consumidores com menor conhecimento sobre orgânicos e pesquisa via internet para um grupo de consumidores membros da Associação de Consumidores de Produtos Orgânicos do Paraná ou indicados por estes. Os resultados microbiológicos demonstraram que a população de mesófilos totais é predominante sobre folhas de alface e nas superfícies amostradas. Detectou-se *E. coli* em superfície de folhas de alface, bancadas de manipulação e caixas de colheita. A presença de *Listeria monocytogenes* foi detectada em folha de alface, caixa, faca e bancada de manipulação de diferentes produtores. Não foi detectada presença de *Salmonella sp*. em qualquer das coletas. Para alfaces colhidas e higienizadas com água da rede, e com sanitizantes, as populações de microrganismos diminuíram, mas após sete dias de armazenamento refrigerado, as populações aumentaram chegando a superar os valores iniciais da alface recém-colhida, exceto para *S. aureus*. Na avaliação sensorial, o tratamento 4 - Sem Lavar e sem sanitização foi significativamente menos aceito ($p<0,05$) em relação aos atributos odor, frescor, integridade da folha, aspecto geral e intenção de compra que os demais tratamentos, os quais não diferiram entre si. Resultados sobre o comportamento do consumidor, provenientes da *Conjoint Analysis*, para o grupo com menor conhecimento sobre orgânicos, demonstraram que as importâncias relativas foram 49,49% para preço, 15,85% para selo orgânico e 34,66% para conveniência, indicando a prevalência do preço na decisão de compra, seguido da conveniência. Para a pesquisa com consumidores mais conscientes sobre produção orgânica as importâncias relativas foram 57,3% para preço, 32,4% para selo da certificadora e 10,3% para conveniência, demonstrando que público com maior informação sobre a produção orgânica também valoriza o preço, mas a presença de selo de

certificação tem mais valor do que a conveniência. Na tarefa de associação de palavras, mesmo sem o selo oficial, os respondentes associam o produto como orgânico e saudável, poucos citam o aspecto sem certificação. A maior classe de palavras citada é "caro", mesmo para o produto de menor preço, demonstrando que a referência de preço é da alface in natura, sem nenhum processamento.

Palavras chaves: sanitização, qualidade, produtos orgânicos

GENERAL ABSTRACT

RIZZO, D. L. **Organic Lettuce - microbiological evaluation related to production and minimal processing and its sensory acceptance study**. 2014. 149f. M. Sc. Dissertation. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Leaf vegetables have been associated as vehicles for pathogens, especially *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* and recently many studies report outbreaks linked to their consumption. Sanitization can avoid contamination but can't reach internal pathogens. Sampling ofsurfaces can be more efficient for human pathogens with erratic behavior. After sanitization loss of sensorial quality and use of chemicals can cause rejection by consumers of organic products. The objectives were: 1 – To quantify microbiota present on lettuce leaves before harvesting, 2 – To track of possible contamination points at the farm, 3 – To evaluate effect of lettuce sanitization on its microbiological and sensorial quality, 4 – To verify the impact of price, convenience and organic certification of lettuce on buying intention of the product. Collection of microorganisms from leaves, hands, boxes, benches and utensils that have contact with production in 10 farms was performed employing cellulose sponges soaked with buffered peptone water. Sensorial and microbiological analyses were performed in lettuces under refrigerated storage at 8ºC, for up to 9 days after harvesting, comparing the following procedures: 1 – Washing with tap water and sanitizing with sodium dichloroisocyanurate dihydrate; 2 – Washing with tap water and sanitizing with calcium oxychloride; 3 – Washing with tap water without sanitizing; and 4 – Without washing or sanitizing. The sensory methods employed to determine consumer behavior were *Conjoint Analysis*, word association and organic attitude scale to verify aspects of consumer product acceptance. Two researches were conducted a direct survey with consumers that had less knowledge about organic products and an internet survey for a group of consumers related to an

organic consumer association. The microbiological results demonstrate that total mesophiles are the main population found on lettuce leaves and surfaces. *E. coli* was detected on surfaces of lettuce leaves, handling benches and harvesting boxes. *Listeria monocytogenes* was detected on lettuce leaves, boxes, knives and handling benches of different producers. Presence of *Salmonella sp*. was not detected in any of the samples. Microorganism populations reduced in harvested lettuces that were washed in tap water and with sanitizers, but after seven days of storage the microbial counts incresaed even above the initial values of recently harvested lettuces, except for *S. aureus*. The sensory evaluation results show that treatment 4 – without washing or sanitizing was significantly less accepted ($p<0.05$) in relation to odor, freshness, leaf integrity, general aspect and buying intention than the other treatments, while all the other treatments presented no significant differences between them. Conjoint Analysis consumer behavior results for the group with less information about organic products demonstrated that the relative importance of the factors were 49.49% for price, 15.85% for organic logo and 34.66% for convenience, indicating that price is the decisive factor for buying lettuce, followed by convenience. The survey with consumers that have more knowledge about organic production the relative importance of the factors were 57.3% for price, 32.4% for certification logo and 10.3% for convenience, which shows that though price is still the most decisive factor, the presence of a certification logo is more important than convenience. The word association task shows that even when the certification logo was not present the product was linked to organic and healthy and only a few mentioned the aspect "without certification". The largest group of words is "expensive" even for the lowest priced product, indicating that the price reference is that of unprocessed lettuce (*in natura*).

Keywords: sanitization, quality, organic products

Lista de ilustrações

Figura 1. Esponjeamento de folhas de alface antes da colheita _____ *68*

Figura 2. Folhas de alface: parte externa, mediana e interna da planta _____ *68*

Figura 3. Placa de compact dry, com colônias vermelhas (características do grupo coliforme) e azuis (característica de E. coli). _____ *71*

Figura 4. Petrifilm STX – Staph Express Count System e colônias vermelho-violetas características. ___ *72*

Figura 5. Contagem de microrganismos em folha de alface no campo _____ *75*

Figura 6. Imagem de tela do Bax System com as amostras positivas para L. monocytogenes _____ *77*

Figura 7. Exemplo de bancada de tela na propriedade rural _____ *78*

Figura 8. Contagens de microrganismos nas bancadas de manipulação de alface _____ *78*

Figura 9. Contagem de microrganismos em caixas de colheita de alface. _____ *79*

Figura 10. Contagem de microrganismos em utensílio (faca) de colheita. _____ *80*

Figura 11. Gráfico de distribuição de microrganismos em mãos, utilizando swab ou esponja (esponj). _ *81*

Figura 12. Espécime: alface não esponjeada após fixação para imagem. _____ *82*

Figura 13. Espécime: alface esponjeada após fixação para imagem. _____ *82*

Figura 14. Imagem de alface não esponjeada (A) e alface esponjeada (B) _____ *83*

Figura 15. Estômatos e superfícies de alface não esponjeada (A) e alface esponjeada (B) _____ *84*

Figura 16. Estômatos em superfície de alface sem contaminações e com presença da microbiota natural. _____ *85*

Figura 17. Fluxograma de processamento de alface minimamente processada. _____ *99*

Figura 18. Ficha para avalição sensorial de alfaces _____ *102*

Figura 19. Quantificação de microrganismo durante armazenamento refrigerado (8ºC), para os tratamentos: SL (sem lavar, sem sanitizar); L(apenas lavada em água da rede); DI (lavada e sanitizada com dicloisocianurato de sódio); OC (lavada e sanitizada com oxicloreto de cálcio) _____ *105*

Figura 20. Embalagem de alface minimamente processada (pesquisa presencial) _____ *122*

Figura 21. Embalagem de alface processada com selo de auditoria (pesquisa internet) _____ *122*

Figura 22. Gráficos da Análise de Componentes Principais aplicada aos resultados da pesquisa presencial. A – Localização dos tratamentos no mapa bidimensional, B – Localização dos provadores. O significado dos códigos dos tratamentos está descrito na Tabela 6. _____ *130*

Figura 23. Influência dos fatores socioeconômicos coletados na pesquisa presencial sobre a intenção de compra de alface. A – Frequência de consumo, B – faixa etária, C – Educação, D – Renda, E – sexo. __ *132*

Figura 24. Gráficos da Análise de Componentes Principais aplicada aos resultados da pesquisa via internet. A – Localização dos tratamentos no mapa bidimensional, B – Localização dos provadores. _ *134*

Figura 25. Influência dos fatores socioeconômicos coletados na pesquisa via internet sobre a intenção de compra de alface. _____ *136*

Figura 26. Gráfico com a avaliação da escala de atitude _____ *141*

Figura 27. Gráfico contendo as palavras associadas aos tratamentos _____ *142*

Lista de tabelas

Tabela 1. Atributo dos alimentos e dos consumidores que exerceriam maior influência sobre a aceitação e seleção dos alimentos. _____ *45*

Tabela 2. Avaliações sensoriais de alface submetidas a diferentes tratamentos de sanitização em três avaliações, aos 2, 4 e 9 dias após colheita. _____ *108*

Tabela 3. Fatores e níveis dos estímulos na Conjoint Analysis _____ *121*

Tabela 4. Questionário sobre atitude sobre produção orgânica _____ *124*

Tabela 5. Características dos participantes na avaliação de alface orgânica. O primeiro dado se refere à pesquisa presencial e o segundo dado se refere à pesquisa via internet. _____ *126*

Tabela 6. Médias de intenção de compra para tratamentos de alface minimamente processada obtidas na pesquisa presencial _____ *127*

Tabela 7. Médias de intenção de compra para tratamentos de alface orgânica minimamente processada obtidas na pesquisa via internet. _____ *128*

Tabela 8. Pesquisa presencial: estimativa dos coeficientes de intenção de compra dos níveis de fatores e importância relativa (%) dos fatores _____ *138*

Tabela 9. Pesquisa via internet: estimativa dos coeficientes de preferencia dos níveis de fatores e importância relativa (%) dos fatores _____ *139*

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL 15

2. OBJETIVOS 17

2.1 OBJETIVOS GERAIS 17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17

3. ESTRUTURA DO TRABALHO 18

CAPÍTULO I 19

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20

1.1 A ALFACE 20
1.2 MICRORGANISMOS IMPORTANTES ASSOCIADOS A HORTALIÇAS 21
1.3 IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS E PROBLEMAS RELACIONADOS A CONTAMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS 23
1.4 SANITIZANTES E MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE VEGETAIS 25
1.5 IMPORTÂNCIA DO SISTEMA DE PRODUÇÃO ORGÂNICO 29
1.6 A IMPORTÂNCIA DA SUPERFÍCIE VEGETAL E DA FILOSFERA NO CONTROLE DE PATÓGENOS HUMANOS 31
1.7 USO DE ESPONJEAMENTO NA SEGURANÇA DO ALIMENTO 36
1.8 IMAGEM DE SUPERFÍCIE VEGETAL 38
1.9 EMBALAGEM E COMPORTAMENTO DO CONSUMIDOR 39
1.10 TÉCNICAS SENSORIAIS RELACIONADAS AO ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE DECISÃO DE COMPRA DO CONSUMIDOR 43

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

CAPÍTULO II 61

USO DE ESPONJEAMENTO PARA A RASTREABILIDADE DE PATÓGENOS HUMANOS EM ALFACE ORGÂNICA 61

1. INTRODUÇÃO 65

2. OBJETIVOS 67

2.1 OBJETIVO GERAL 67

3. MATERIAL E MÉTODOS 67

3.1 AMOSTRAGEM DE PLANTAS DE ALFACE NO CAMPO 67
3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 70
3.3 IMAGEM DE SUPERFÍCIE DE ALFACE EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA 73

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 74

4.1 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM ALFACE 74
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM BANCADAS 77
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NAS CAIXAS DE COLHEITA 79
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA FACA DE COLHEITA 80
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NAS MÃOS DOS MANIPULADORES 81
4.6 RESULTADOS DAS IMAGENS DE SUPERFÍCIES DE ALFACES 82

5. CONCLUSÕES 86

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

CAPÍTULO III 90

ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL DE ALFACE ORGÂNICA MINIMAMENTE PROCESSADA, LAVADA COM ÁGUA DA REDE E SANITIZADA, DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO. 90

1. INTRODUÇÃO 95

2. OBJETIVOS 97

2.1 OBJETIVO GERAL 97

3. MATERIAL E MÉTODOS 97

3.1 MATÉRIA-PRIMA E AMOSTRAGEM 97
3.2 PRODUÇÃO DA ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA 98
3.3 TRATAMENTOS 99
3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 100
3.5 ANÁLISES SENSORIAIS 100

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 102

4.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 102
4.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES SENSORIAIS 107

5. CONCLUSÕES 109

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 110

CAPÍTULO IV 112

INFLUÊNCIA DA CERTIFICAÇÃO ORGÂNICA, PREÇO E CONVENIÊNCIA NA DECISÃO DE COMPRA DE ALFACE ORGÂNICA MINIMAMENTE PROCESSADA 112

1. INTRODUÇÃO 117

2. OBJETIVOS 119

2.1 OBJETIVO GERAL 119
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 120

3. MATERIAL E MÉTODOS 120

3.1 ESTÍMULOS 121
3.2 ESCALA UTILIZADA 123
3.3 QUESTIONÁRIO DE ATITUDE SOBRE PRODUTOS ORGÂNICOS 123
3.4 APLICAÇÃO DOS QUESTIONÁRIOS AOS PARTICIPANTES 124

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 126

4.1 DADOS SOCIOECONÔMICOS DOS ENTREVISTADOS 126
4.2 VALORES DE INTENÇÃO DE COMPRA ATRIBUÍDOS AOS TRATAMENTOS NAS PESQUISAS PRESENCIAL E VIA INTERNET 127
4.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS 129
4.2 RESULTADOS DA *CONJOINT ANALYSIS* 137
4.3 RESULTADOS DA ESCALA DE ATITUDE 140
4.4 RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO E PALAVRAS 141

5. CONCLUSÕES 144

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 145

1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento do consumo de frutas e vegetais e um sistema mais eficiente de distribuição de produtos frescos contribuíram para o aumento de doenças infecciosas no homem associadas a esta produção. Patógenos podem ser contaminantes antes da colheita e no pós-colheita, mas se esta ocorrer é difícil realizar a descontaminação. Métodos de descontaminação da superfície dos vegetais não são eficientes e os patógenos de maior importância relatados nos surtos são *Salmonella sp. e Escherichia coli* O157:H7 (BERGER *et al*., 2010; OLAIMAT e HOLLEY, 2012).

Surtos alimentares são considerados problemas em saúde pública, pelo número de pessoas afetadas e seus custos econômicos. Scharff (2010) estima que nos EUA, a cada ano, ocorrem 20 milhões de casos associados a frutas e hortaliças contaminadas e o custo é de 38,6 bilhões de dólares por ano.

Os sistemas de cultivo podem afetar a qualidade intrínseca de hortaliças. O sistema orgânico apoia-se em práticas conservacionistas de preparo do solo, rotações de culturas e consórcios, no uso da adubação verde e de controle biológico de pragas, com emprego eficiente dos recursos naturais (REIS, 2005). As premissas para a produção orgânica obedecem a Instrução Normativa nº46, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 6 de outubro de 2011 (BRASIL, 2011).

Para os Sistemas de Certificação Orgânica, no Brasil e em outras partes do mundo, existe a garantia do produto via certificação e o consumidor pode reconhecer a produção orgânica pela presença do selo oficial de orgânicos (BRASIL, 2007a).

O processamento mínimo ocasiona alterações físicas e fisiológicas que afetam a viabilidade e a qualidade do produto. Para continuarem

viáveis, os produtos processados devem ser mantidos frescos e com a qualidade preservada por um período razoável de tempo (SEBRAE, 2012). Os produtos minimamente processados apresentam exigências específicas de produção e manuseio para que sejam garantidas suas qualidades organolépticas, nutricionais e microbiológicas até a venda ao consumidor final (SEBRAE, 2008).

No Brasil, não existe uma legislação específica para alimentos minimamente processados; seguem-se os padrões microbiológicos estabelecidos na Resolução RDC Nº12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, para frutas e/ou hortaliças "frescas, *in natura*, preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto". A RDC 12/01 estabelece ausência de *Salmonella* em 25 g e contagem máxima de coliformes termotolerantes ou *E. coli* de 5.10^2 UFC.g^{-1} para frutas e 1.10^2 UFC.g^{-1} para hortaliças (BRASIL, 2001).

Segundo a resolução nº 150 MS (28/05/99) são autorizados produtos com sais de sódio e de potássio do ácido dicloroisocianúrico para desinfecção de água para consumo humano (BRASIL, 1999a). A RDC nº 02 (08/01/2004) permite o uso de ácido peracético como coadjuvante na lavagem de vegetais, seguida de enxágue, ou em concentrações que não deixem resíduos no produto final (BRASIL, 2004).

Entretanto, sais de cloro são considerados precursores na formação de trihalometanos, prejudiciais à saúde devido ao seu alto potencial carcinogênico (McNEAL, HOLLIFIELD e DIACHENKO, 1995). Deste modo, é importante verificar se a descontaminação é eficiente, para que se justifique o risco do uso de sais de cloro, para os consumidores, manipuladores e meio ambiente.

Apesar de existir legislação própria para o uso de sanitizantes em produtos orgânicos (BRASIL, 2009), a utilização de sanitizantes em alface orgânica minimamente processada cria um paradigma visto que os

produtos orgânicos são geralmente conhecidos e valorizados por sua "natureza pura", não sendo utilizados produtos químicos de composição sintética, reguladores de crescimento ou outros agentes que contrariem as normas estabelecidas para sua produção.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foram rastrear possíveis pontos de contaminações microbiológicas antes da colheita; avaliar o efeito do uso apenas da água da rede, comparado a sanitizantes permitidos pela legislação orgânica na conservação e aceitabilidade de alface orgânica minimamente processada e verificar o conhecimento e impressões que os consumidores têm sobre alface minimamente processada e sanitizada.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o uso do esponjeamento em superfícies vegetais e ambiente como método de amostragem de microrganismos e ferramenta para detecção de patógenos humanos;
- Detectar a incidência de *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella sp. e Escherichia coli* no ambiente e utensílios nas propriedades rurais;
- Comparar o uso de apenas de lavagem com água da rede, uso de sanitizantes dicloroisocianurato de sódio dihidratado e oxicloreto de cálcio, na qualidade microbiológica e aceitação sensorial da alface orgânica, durante armazenamento refrigerado;
- Utilizar as técnicas de análise sensorial para explorar o comportamento do consumidor de orgânicos.

3. ESTRUTURA DO TRABALHO

O capítulo I, **Revisão bibliográfica**, descreve tópicos de importância sobre o cultivo de alface, sistema de cultivo orgânico, sanitização de produtos minimamente processados, superfície de vegetais, aspectos relativos à análise sensorial e comportamento do consumidor de orgânicos.

O capítulo II, **Uso de esponjeamento para a rastreabilidade de patógenos humanos em alface orgânica**, descreve os resultados de análises microbiológicas realizadas com diferentes técnicas de amostragem de superfícies de alface no campo e superfícies de caixas, mãos, bancadas e utensílios que entram em contato com a matéria prima.

O capítulo III, **Estabilidade microbiológica e sensorial de alface orgânica minimamente processada lavada com água da rede e sanitizada durante o armazenamento refrigerado**, é um estudo sobre a eficiência de lavar sob água da rede e tratamentos descontaminantes para alface minimamente processada e seus efeitos sobre a microbiota presente na superfície das folhas, assim como seus efeitos sobre a avaliação sensorial do produto armazenado.

O capítulo IV, **Influência da certificação orgânica, preço e conveniência na decisão de compra de alface orgânica minimamente processada**, descreve os resultados das técnicas *Conjoint Analysis* e associação de palavras aplicadas para alface orgânica minimamente processada.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Revisão Bibliográfica

1.1 A alface

Dentre as hortaliças, a alface (*Lactuca sativa L.*) é a folhosa mais consumida no Brasil. Em algumas centrais de distribuição, o conjunto das variedades de alface representa quase 50% de todas as folhosas que são comercializadas e, dentre essas, a alface crespa corresponde a quase 40% do total (EMBRAPA, 2006). De acordo com o IBGE (2006) a produção nacional de alface é de aproximadamente 525.602 toneladas/ano, sendo que a região sudeste tem a produção de 346.151 toneladas/ano. Quanto ao volume de vendas, na CEAGESP, em 2010, foram comercializados R$247.664.875,00 em hortaliças folhosas (CEAGESP, 2010).

A alface (*Lactuca sativa*) é provavelmente originária do Egito, onde as primeiras indicações de sua existência datam de 4.500 a.C. (LINDQVIST, 2010). É uma hortaliça folhosa, herbácea, que apresenta diversidade de cultivares. A alface constitui uma importante fonte de sais minerais, principalmente de cálcio e de vitaminas, especialmente a vitamina A. Juntamente com o tomate, é a hortaliça mais utilizada para as saladas devido ao seu sabor agradável e refrescante e facilidade de preparo (EMBRAPA, 2012).

A alface americana é uma variedade bastante difundida no mercado americano, onde o consumo das folhas mais claras do miolo, picadas, é preferido. Quando processada, ocorre perda aproximada de 40% da matéria prima, pois as folhas externas de cor verde escura são descartadas (SALA e COSTA, 2012).

O consumidor brasileiro prefere a alface crespa que possui folhas soltas e inteiras e os pesquisadores, desde a década de 60, buscam o melhoramento para obtenção de alface crocante de folhas soltas. Apenas recentemente, fruto do melhoramento genético, o mercado

conta com tal variedade. Uma das vantagens da variedade, além da preferência de consumo, é a melhor adaptação às condições tropicais, pois não forma o miolo que favorece o acúmulo de água nas folhas internas e portanto fitopatógenos que dificultam o manejo da lavoura (SALA e COSTA, 2012).

A composição da hortaliça influi em sua resistência ao estresse do processamento. O elevado teor de açúcares em variedade crespa de alface relaciona-se com a sua vida de prateleira mais longa, porém não reduz sua sensibilidade à mancha-marrom, que aparece na nervura central da folha, quando em concentrações de CO_2 > 3%, em refrigeração. A alface americana é a mais apropriada para o processamento mínimo por apresentar maior espessura das folhas, o que a torna mais resistente que as demais às operações de processamento (MORETTI, 2007).

1.2 Microrganismos importantes associados a hortaliças

Microrganismos aeróbicos mesófilos são capazes de crescer em temperatura de 35-37°C, indicam a qualidade sanitária com que o alimento foi obtido ou processado. O número elevado indica que o alimento é impróprio, e todas as bactérias patogênicas ao homem são mesófilas, além disso, pode significar menor vida de prateleira. Os psicrotróficos são mesófilos que se desenvolvem em ambiente refrigerado (FRANCO E LANDGRAF, 2005).

Bolores e leveduras são responsáveis pela deterioração de vários alimentos, inclusive frutas e vegetais, podendo ser indicativo da presença de micotoxinas (FRANCO E LANDGRAF, 2005) e segundo Barbosa-Cánovas (2003), são os principais contaminantes e organismos de deterioração em frutas e legumes frescos.

O grupo dos coliformes totais é o principal indicador utilizado para avaliar a qualidade de alimentos. Fazem parte deste grupo,

predominantemente, bactérias dos gêneros *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter e Klebsiella* (FRANCO E LANDGRAF, 2005).

Embora muito úteis como indicadores de qualidade, possuem limitações, pois patógenos, especialmente cistos e oocistos de protozoários são mais resistentes à desinfecção que os coliformes. Cistos de *Giardia* são 100 vezes mais resistentes que vírus e estes mais resistentes que *E. coli* (TORTORA, FUNKE e CASE; 2012).

E. coli é um clássico termotrófico deste grupo que naturalmente habita o trato intestinal de homens e animais de sangue quente, sendo um indicador de contaminação fecal. É restrito a esse *habitat* e sobrevive pobremente fora deste, embora possa crescer em alimentos com pH≤ 7 e a_w > 95 (LECLERC *et al.,* 2001). *E. coli* é um microrganismo normalmente inofensivo à saúde humana, mas certas linhagens que possuem fímbrias especializadas são patogênicas (TORTORA, FUNKE e CASE; 2012).

Santana *et al.* (2010) relataram que *Staphylococococus aureus* tem como principais reservatórios o homem e os animais. Este microrganismo se multiplica com facilidade em vários alimentos e produz enterotoxinas (EE) termorresistentes. São conhecidos 20 tipos diferentes de EE que são detectáveis nos alimentos que apresentam populações de *S. aureus* acima de 10^5 UFC/mL de alimento. A dose mínima de EE ingerida para causar intoxicação é 100 ng. Essa bactéria possui cepas resistentes a antibióticos e são responsáveis por infecções hospitalares.

O microrganismo *Listeria monocytogenes* é um psicrotrófico patogênico, que apesar de raro, causa sérios problemas para grupos com o sistema imunológico deficiente, como idosos, grávidas e crianças, ocorrendo 1 morte a cada 5 casos (CDC, 2013).

1.3 Importância dos produtos minimamente processados e problemas relacionados a contaminações microbiológicas

Frutas e hortaliças possuem aproximadamente 10^9UFC/g de microrganismos depois de colhidas e os mais comuns são bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As bactérias mais frequentes são *Erwinia herbicola* e *Enterobacter agglomerans,* bactérias láticas como *Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus sp.* e podem ocorrer bactérias patogênicas como do gênero *Salmonella, Clostridium,* e estirpes de *E. coli,* mas o gênero *Pseudomonas* geralmente é responsável por 50% a 90% da população microbiana de vegetais (MORETTI, 2007).

Mariano *et al.*(2004) apontam que o gênero *Pseudomonas sp.* representa as principais bactérias promotoras de crescimento de plantas que podem ser epifíticas ou endofíticas, não sendo fitopatogênicas, como também não são patogênicas ao homem.

Outros microrganismos podem se desenvolver durante o transporte, processamento e armazenamento advindo da manipulação e condições do ambiente (MORETTI, 2007).

O processamento mínimo realiza alterações físicas em vegetais, com descascamento e cortes, mantendo o vegetal metabolicamente vivo. No Brasil, este tipo de atividade iniciou-se no final da década de 70 e a partir de meados dos anos 90, a pesquisa e desenvolvimento de tecnologia na área possibilitaram que empresários pudessem atuar no setor de forma mais organizada, sustentável e competitiva (MORETTI, 2007).

A segurança da hortaliça processada minimamente é pressuposto básico para o sucesso do empreendimento, a observância de regras básicas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a adoção de ferramentas de gestão de qualidade, como a Análise de Perigos e

Pontos Críticos de Controle (APPCC), promovem produtos seguros e livres de contaminação química, física e microbiológica (MORETTI, 2007).

Apesar de muitos trabalhos sobre o tema, a contaminação microbiológica em hortaliças ofertadas aos consumidores é frequente, como na avaliação da qualidade de hortaliças na cidade de Ribeirão Preto, onde 53,1% de amostras apresentavam *E. coli* (OLIVEIRA, 2008).

A contaminação por patógenos humanos pode ocorrer devido aos seguintes fatores: resultado da incursão de animais nas áreas de cultivo; utilização de irrigação ou de água contaminada de processamento; incursão de fezes humanas ou animais na área de plantio; manipulação do alimento por pessoas infectadas (IOM, 2012).

A maior parte dos surtos alimentares em folhas verdes é causada por contaminações com *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), seguido por *Salmonella sp.* Após as folhosas, melões e tomates são os vegetais mais comumente associados aos surtos, contaminados com *Salmonella* (IOM, 2012).

O maior surto de *E. coli* é recente, declarado finalizado em 26/07/2011. Mais de 4.321 pessoas, de 14 países foram contaminadas, com 50 mortes. Acredita-se que a doença foi trazida para a Europa em sementes de feno-grego importadas do Egito. Dos afetados, 852 pessoas desenvolveram a síndrome hemolítica urêmica (HUS). A cepa em questão foi a O104:H4 (BUCHHOLZ *et al.,* 2011).

Outro surto letal, de grandes proporções, foi causado por *Listeria monocytogenes*. Ocorrido em 2011, acometeu 24 estados dos EUA e foi o primeiro relato de infecção de *L. monocytogenes* em melão. Seu saldo foi de 261 casos e três mortes (CDC, 2012).

Venneria *et al.* (2012) verificaram, em vegetais minimamente processados, que as populações microbianas (mesófilos, *Pseudomonas sp.* e fungos) aumentaram no final da vida de prateleira. Os autores

aconselham que, mesmo sendo convenientes, os produtos minimamente processados devem ser consumidos o mais breve possível para beneficiar-se dos nutrientes.

Horev *et al*. (2012) apontaram o risco potencial da atmosfera modificada ativa para produtos frescos, pois demonstraram que esta não foi eficiente contra *Salmonella enterica* em alface, favorecendo a sobrevivência do patógeno. Concluíram que o uso de técnicas apropriadas de pré-colheita e pós-colheita, e práticas de saneamento são as medidas mais importantes para garantir a segurança microbiológica dos produtos frescos.

1.4 Sanitizantes e métodos de descontaminação de vegetais

Segundo a RDC 14 de 28/02/2007, sanitizante é definido como um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde (BRASIL, 2007b).

A sanitização tem um importante papel na diminuição da deterioração e na manutenção da qualidade de vegetais (BRACKETT, 1992). A lavagem de vegetais deve ser 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 seguros (BEUCHAT, 1996).

Os produtos clorados, como os sais de hipoclorito, constituem o grupo mais utilizado de sanitizantes, pois são eficientes e de baixo custo, tendo larga aplicação em indústrias de frutas e hortaliças (KIM, YOSEF e DAVE, 1999). Mas componentes de tecidos das frutas e vegetais neutralizam o cloro e fendas naturais dos tecidos são inacessíveis ao ácido hipocloroso, que é o componente ativo dos compostos a base de cloro, contribuindo para a ineficiência do cloro. A característica hidrofóbica da cutícula de frutas e vegetais protege as células dos microrganismos (WHO, 2008).

Leitão *et al.* (1981) realizaram um estudo sobre a eficiência de compostos químicos a base de cloro, em alface. Observaram que no tratamento das folhas cortadas, sem lavagem prévia, ocorreu a diminuição sensível da concentração inicial dos produtos sanitizantes, não ocorrendo o mesmo com as folhas lavadas inteiras, onde a redução foi pouco pronunciada.

Ahvenainen (1996) observou que em folhas de alface, os compostos clorados reduzem o teor de microrganismos aeróbios, mas uma segunda lavagem depois de desfolhamento ou corte é necessária para a remoção de microrganismos e fluído de tecidos, reduzindo-se, assim, o crescimento microbiano e a oxidação enzimática durante o armazenamento.

Devido ao risco de formação de trihalometanos e baixa eficiência em algumas situações, diversos agentes sanitizantes têm sido propostos como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização de hortaliças. Em outros países, agentes como vinagre, ácido acético e ácido peracético são considerados tão eficazes quanto o cloro, e aceitos em função das controvérsias sobre a toxicidade do cloro nos alimentos. De modo semelhante, o dióxido de cloro vem recebendo atenção especial (ARENSTEIN, 2003), pois embora seja um derivado do cloro, ele gera quantidade insignificante de trihalometano, caracterizando-se como um produto de baixo potencial carcinogênico.

O documento editado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008) cita desvantagens na utilização do produto clorado: há formação de Cl_2 tóxico quando o pH cai abaixo de 4; há vaporização do cloro quando a temperatura da água se eleva; o cloro perde rapidamente sua atividade quando em contato com matéria orgânica e quando exposto ao ar, luz ou metais. Além do mais, há uma preocupação grande com trabalhadores que podem ter irritação da

pele e no trato respiratório quando em contato prolongado com o vapor do cloro.

Ferreira (2009) elaborou ampla revisão sobre a formação de trihalometano (gás clorofórmio), sob os aspectos de saúde de consumidores e manuseadores de produtos relacionados com doenças como o câncer e diabetes. Verificaram que o dicloroisocianurato de sódio originou maior formação de gás clorofórmio, seguida da solução de hipoclorito de sódio. Ao contrário, o vinagre e o ácido peracético resultaram em menor formação.

A formação de trihalometano não é um parâmetro avaliado nos sistemas de processamento, mas mesmo que o composto clorado não tenha tempo suficiente para se unir à matéria orgânica durante o processamento, seu uso pode afetar a saúde dos trabalhadores e a água residual com o cloro, descartada ao meio ambiente encontrará matéria orgânica em abundância.

O processamento orgânico possui legislação própria para o uso de sanitizantes no pós-colheita, definidos pela Instrução Normativa Conjunta Nº 18, de 28 de Maio de 2009 que permite o uso de vários sanitizantes, entre eles, o cloreto de cálcio é permitido, desde que não tenha substituto. São permitidos sem restrição, por exemplo, dicloro -s-triazinatriona de sódio (BRASIL, 2009b) e dióxido de cloro e hipoclorito de sódio (BRASIL, 2011a).

Há poucos estudos publicados sobre a sanitização de hortaliças com oxicloreto de cálcio. O oxicloreto de cálcio é um sal inorgânico formulado à base de hipoclorito de cálcio, indicado para uso em pós-colheita de frutas e hortaliças.

Há trabalhos com diversas alternativas de sanitização. Gopal *et al.* (2010) estudaram a aplicação do sistema de prata / peróxido de hidrogênio para alface minimamente processada. Concluíram que esta

alternativa tem potencial de aplicação na indústria de alimentos minimamente processados, no entanto, regulamentos adequados devem ser propostos e a aceitação do consumidor deve ser avaliada.

Alternativas para métodos químicos de descontaminação foram propostos por Luo *et al.* (2012) com o uso de bateriófagos em folhas de alface. Bacteriófagos são vírus predadores naturais de bactérias e têm especificidade para estirpes selecionadas. A elevada atividade bactericida ocorre pela rápida amplificação dos fagos no citoplasma bacteriano, seguido por lise das bactérias. Os resultados demonstraram que os fagos aplicados à superfície da folha de alface foram eficazes em redução do número de células bacterianas na superfície e no interior das folhas em cerca de 2-2,5 log após 24 h de tratamento. Os fagos podem controlar patógenos internalizados em folhas verdes intactas.

Gil *et al*.(2009) concluíram que os sanitizantes reduzem a população natural de microrganismos na superfície dos produtos em 2 a 3 unidades log. Mas a contagem total bacteriana depois do armazenamento é similar quando os produtos são lavados em água da rede ou com sanitizantes. Alguns autores sugerem que lavar com sanitizantes reduz a contagem inicial de cepas inoculadas e a população inicial de mesófilos, mas estes podem aumentar mais rapidamente e até exceder o nível comparado ao lavado na água da rede, durante longo armazenamento.

Olmez e Temur (2010) verificaram a ineficiência da sanitização em biofilmes de *E. coli e L. monocytogenes*. Sugerem que a quebra da ligação hidrofóbica nas superfícies de folhas deve ser investigada. Como a cutícula de folhas de alface é coberta por cera, interações hidrofóbicas podem ser as maiores forças afetando a fixação bacteriana e o uso de surfactantes pode ajudar na interrupção de tais interações.

A temperatura da água para lavagem de vegetais pode contribuir para a internalização de patógenos. Uma fruta em um banho mais frio que esta terá seus espaços internos contraídos, incorporando fluido, e qualquer bactéria será internalizada. Este foi o caso ocorrido com as mangas brasileiras, em 1999, quando o tratamento para exportação favoreceu a incorporação de *Salmonella*. Além disso, ferimentos em tecidos vegetais são ótimos lugares para infecção com patógenos humanos (IOM, 2012).

Li, Tajkarimi e Osburn (2008) observaram que o resfriamento a vácuo aumentou a internalização de patógenos em tecidos intactos de alface quando comparado ao controle não tratado a vácuo.

Um dos aspectos que pode ser levado em consideração sobre sanitização é que patógenos humanos podem não apresentar sintomas em vegetais. Teplitski *et al.* (2012) verificaram que plantas contaminadas com *Salmonella ou E. coli* O157: H7 não apresentaram sinais de doença ou desenvolveram respostas comum à infecção por patógeno de planta, da mesma forma, frutos de tomate colonizados com *Salmonella Typhimurium* (até 10^7 UFC/g) não apresentaram sinais de deterioração, por cerca de 2 semanas à temperatura ambiente.

1.5 Importância do sistema de produção orgânico

O cultivo da alface pode ser realizado no sistema convencional, hidropônico e orgânico. O sistema orgânico de produção agropecuária e industrial tem como objetivos ofertar produtos saudáveis e de elevado valor nutricional, isentos de quaisquer tipos de contaminantes que ponham em risco a saúde do consumidor, do agricultor e do meio ambiente; preservar e ampliar a biodiversidade dos ecossistemas; conservar as condições físicas, químicas e biológicas do solo, da água e do ar; fomentar a integração efetiva entre agricultor e consumidor final de produtos orgânicos (BRASIL, 1999b; 2003; 2011b).

Quanto ao mercado, os produtos oriundos do sistema de produção orgânico vêm alcançando grande aceitação do público consumidor, com preços mais elevados e garantia de mercado interno, bem como para atendimento potencial do grande mercado externo (EMBRAPA, 2007).

Sobre o valor nutricional, Dangour *et al.*, (2009) realizaram revisão sistemática sobre o assunto, comparando alimentos orgânicos e convencionais. Em 52.471 artigos científicos, entre 1958 a 2008, concluíram que não houve diferença significativa em conteúdo de vitamina C, magnésio, cálcio, potássio, zinco, cobre, e componentes fenólicos entre os métodos de cultivo. Alimentos convencionais apresentaram tendência de maior conteúdo de nitrogênio (devido aos fertilizantes sintéticos) e vegetais orgânicos, maior conteúdo de fósforo e ácidos (que pode ser devido ao estado de maturação quando da colheita).

O maior conteúdo de nitrogênio em alimentos convencionais está relacionado aos nitratos que são associados com o aumento do risco de câncer gastrointestinal e metahemoglobinemia em crianças (FORMAN e SILVERSTEIN, 2012). A alface produzida em sistema orgânico, além de apresentar ótimos resultados de ordem produtiva e nutricional (YURI *et al*., 2004), pode apresentar teores de nitrato reduzidos (COMETTI *et al*., 2004).

O valor nutricional e o aspecto toxicológico dos alimentos provenientes do sistema orgânico de cultivo, entre eles a alface, têm se mostrado vantajosos quando comparados aos alimentos provenientes dos sistemas convencionais (SOUZA e REZENDE, 2003). No entanto, um dos pontos mais questionados pelos críticos da agricultura orgânica é a contaminação microbiológica do produto agrícola causada pelo uso intensivo de dejetos de animais, no entanto a produção convencional de hortaliças também se utiliza de tal prática (DAROLT, 2003).

Alguns estudos abordaram tal problema. Segundo Oliveira *et al.* (2010), 22% das amostras de alface orgânicas tinham contaminação

com *E. coli* contra 12% das amostras de alface convencional, mas nenhuma apresentou a estirpe O157:H7. Outro trabalho descreveu resultados onde a população média de mesófilos e psicrotróficos, leveduras, bolores, bactérias láticas e coliformes não diferiram estatisticamente, em folhosas cultivadas em sistema convencional e orgânico (PHILLIPS e HARRISON, 2005).

Patógenos humanos podem sobreviver no meio ambiente: solo, fezes de animais, insetos, etc., mas também podem sobreviver em água filtrada e pesticidas, conforme descrito em ampla revisão de Olaimat e Holley (2012). Além disso, o período de tempo de sobrevivência pode ultrapassar anos.

Rebanhos bovinos alimentados intensivamente com ração, tem o pH do rúmen alterado, propiciando a colonização do estômago do animal com *E. coli* STEC, sendo assintomático para o animal (TORTORA; FUNKE e CASE, 2012). Este fato pode ser de importância na escolha da procedência de estercos no sistema produtivo, tanto orgânico quanto convencional.

Devido ao grande número de fatores que afetam a sobrevivência dos patógenos, durante a produção, no pós-colheita e processamento, assim como o grande número de fatores que afetam a eficiência dos sanitizantes, há uma controvérsia nos resultados e dificuldades na comparação entre estes.

1.6 A importância da superfície vegetal e da filosfera no controle de patógenos humanos

Leveau (2009) relatou que, em termos simples, a superfície vegetal e os microrganismos associados a ela se chama filosfera. Até hoje, o foco tradicional de pesquisa sobre filosfera se concentrou em microrganismos que são de importância agrícola, em particular fitopatógenos e seus antagonistas, mas a descoberta de bactérias, tais como a *Pseudomonas syringae,* em ambiente não agrícola e a

detecção de enteropatógenos humanos, tais como *Escherichia coli* O157: H7 em superfície foliares leva a mudanças neste enfoque.

A superfície é o maior determinante biogeográfico de população microbiana, pois permite seu crescimento, sua adesão, dispersão e difusão de compostos, e delimita o crescimento espacial em ambientes favoráveis (ANDREWS e HARRIS, 2000).

A filosfera pode ser vista como um ambiente muito difícil para a sobrevivência de patógenos devido a condições extremas de falta de umidade, incidência de raios ultravioleta, ventos fortes e calor. Entretanto as bactérias são os microrganismos com maior população na superfície das folhas (10^6 a 10^7 células por cm^2), com mecanismos que evitam ou toleram os estresses. A superfície das folhas é um dinâmico meio ambiente onde as atividades microbianas tem lugar (BAKER *et al.*, 2010).

Todas as plantas vivem em associação com microrganismos que podem colonizar a superfície (colonização epifítica) ou ocupar os espaços intercelulares (colonização endofítica) de tecidos vegetais. Mesmo em um ambiente hostil, como a superfície foliar, uma diversificada comunidade está presente como: bactérias, fungos filamentosos, algas e, menos frequentemente ocorrem protozoários e nematóides. Bactérias do gênero *Pantoea* (antiga *Erwinia*) e da espécie *Pseudomonas syringae* são os microrganismos colonizadores epifíticos mais abundantes (ANDREWS e HARRIS, 2000).

O interior das folhas é um ambiente mais favorável para microrganismos, pois a umidade é controlada pela cutícula, que contém cera e minimiza as perdas de água, e pelas pequenas aberturas, que são os estômatos, cuja função é permitir a troca gasosa e perda de água. Quando abertos, permitem a entrada aos espaços intercelulares das folhas (apoplasto) e permitem a colonização interna (BEATTIE e LINDOW, 1995, 1999).

Zerdas (2009) obteve imagens que permitem observar bacilos aderidos às superfícies, sendo os estômatos um abrigo e porta de entrada das células para os patógenos, pois a abertura estomática tem dimensão até cinco vezes maior que o tamanho de bactérias.

Apesar do estômato se fechar na presença de flagelos bacterianos, *Salmonella e E. coli* O157:H7 conseguem interferir na abertura do estômato e penetrar na planta (MELOTTO *et al*., 2006; SALDAÑA *et al*., 2011). Além disso, *E. coli* possui os mecanismos de quimiotaxia e quorum sensing que a direciona diretamente ao estômato e o induz a abrir (SALDAÑA *et al*., 2011).

A luminosidade também afeta microrganismos sobre vegetais. Sobre folhas de alface, *Salmonella* apresentou distribuição errática, mas sob luz, se localizaram perto do estômato, possivelmente porque é o local onde ocorre liberação de produtos da fotossíntese (KROUPITSKI *et al*., 2009). A área mais comum para a formação de agregados de bactérias sobre plantas são na base dos tricomas, em volta dos estômatos e acompanhando as nervuras das folhas (ARUSCAVAGE, PHELAN, LEJEUNE; 2006).

No meio ambiente, microrganismos são muito responsivos a superfícies e a adesão pode ser uma resposta à condição oligotrófica e que frequentemente estimula a produção de polímeros extracelulares (ANDREWS e HARRIS, 2000). Olmez e Temur (2010) observaram que o início de formação de biofilme por *E. coli* e *L. monocytogenes,* sobre folhas intactas de alface, ocorreu após 24 horas de incubação a 10ºC. Niemira e Cooke (2010) reportaram a formação de biofilme para *E. coli* O157:H7 após 24 horas a 4 °C.

Na superfície de vegetais, água livre é requerida para o crescimento bacteriano e alta umidade (>90%) para crescimento de leveduras que tendem a ser colonizadores ativos na superfície das folhas; fungos são transientes e existem em formas de esporos dormentes, sendo seu crescimento em folhas sadias intactas, relativamente raro (ANDREWS e HARRIS, 2000).

Cooley, Chao e Mandrel (2006) afirmaram que *E. coli* O 157:H7 pode sobreviver em pequeno número no solo e sobre plantas. Ocasionalmente, condições favoráveis podem ocorrer no campo e levar a contaminação da produção.

As interações entre microrganismos no filoplano são muito complexas. A epífita *Enterobacter asburiae* diminui a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em 20-30 vezes sobre as folhas. Esta competição pode ser o resultado da utilização de substâncias presentes nos exsudatos de plantas por *E. asburiae* que também são utilizados por *E. coli*. Boas práticas agrícolas que aumentem a população de *E. asburiae* podem diminuir a contaminação da produção (COOLEY, CHAO e MANDREL, 2006).

A capacidade de patógenos humanos colonizarem plantas pode ser influenciada por suas interações positivas ou negativas com outras bactérias. Interações positivas podem ser devido à presença de outras bactérias ou fungos que produzem fontes de carbono disponível (via de degradação de polímeros da parede celular ou secreção induzida de açúcares), que de outra forma seria inacessível aos patógenos humanos. Alternativamente, patógenos de plantas que causam ferimento ou destruição de tecidos vivos podem criar um microambiente que é mais favorável para a sobrevivência e / ou a replicação de patógenos humanos, tais como *Salmonella sp. e E. coli* O157: H7 (DEERING, MAUER e PRUIT, 2012).

Zerdas (2009) concluiu que a adesão de *Salmonella Enteriditis* sobre superfícies de folhas de alface foi influenciada pelo caráter e magnitude hidrofóbica da superfície foliar de alface, sendo que a hidrofobicidade varia com o estádio de desenvolvimento da planta. A adesão foi maior nas folhas internas e externas que se apresentaram como hidrofóbicas já as folhas intermediárias apresentaram menor adesão e foram caracterizadas como hidrofílicas, em concordância com os aspectos termodinâmicos que regem a adesão bacteriana.

Salmonella e *E. coli* O157:H7 podem se internalizar em uma variedade de tecidos de plantas e inúmeros fatores podem influenciar a extensão da internalização (DEERING, MAUER e PRUIT, 2012). No campo, a internalização de *E. coli* O157:H7 em folhas de alface foi reportada quando foi aspergido 8 log UFC/mL na face abaxial das folhas, sendo detectada até 14 dias após a inoculação (ERICKSON *et al*., 2010a). Ao contrário, não foi detectada internalização de *E. coli* O157:H7 nas folhas, quando esta foi inoculada no solo, via composto (ERICKSON *et al*., 2010b).

Zhang *et al.* (2009), testando a inoculação de várias cepas de *E. coli* O157:H7 no solo ou nas folhas de várias variedades de alface, verificaram que a internalização de *E. coli* O157:H7 não ocorreu nem pelas folhas nem pelas raízes de alface, independente da cepa da bactéria e idade e variedade da alface. O estresse hídrico ou térmico durante o cultivo de alface também não promoveu a internalização.

Microfotografias eletrônicas mostram que as células de *E. coli* ficam localizadas no estômato onde permanecem protegidas, explicando a baixa eficácia dos sanitizantes neste estudo (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al*. 2010).

Rastogi *et al.* (2012) estudaram a microbiota em alface cultivada e concluíram que os coliformes fazem parte da microbiota natural da alface e que desta forma é preciso tomar cuidado ao correlacionar a contagem total de coliformes com contaminação fecal.

Quanto à época e localização geográfica, comunidades bacterianas sobre folhas de alface são diferentes durante o verão e o inverno ou se produzidas em região norte ou sul (RASTOGI *et al*., 2012). Dados do estudo de Nunes (2010) permitem concluir que cada planta possui sua própria comunidade microbiana. Plantas geneticamente idênticas localizadas em diferentes regiões possuem filosfera com comunidades bacterianas diferentes.

Foi encontrada maior população de bactérias na filosfera de alface na primavera, comparada com o verão. Plantas irrigadas por aspersão tiveram um maior nível de bactérias que plantas irrigadas por gotejamento, independente da estação do ano. Em contraste, os níveis populacionais não foram diferentes entre verão e outono (MOYNE *et al.*, 2011).

Os 13 mais abundantes gêneros identificados em alface foram: *Pseudomonas (17%), Bacillus (7%), Pantoea (6%), Massilia (5%), Xanthomonas (4%), Alkanindiges (3%), Erwinia, Duganella e Acinetobacter (2%* cada um*) e Flavobacterium, Naxibacter, Exiguobacterium* e *Arthrobacter (1%* cada um*). Pseudomonas* é o gênero dominante na filosfera de alface no campo. A família *Enterobacteriaceae* foi representada, na filosfera de alface, por *Erwinia* e *Pantoea*, que são os coliformes reconhecidamente associados à alface (RASTOGI *et al*., 2012).

1.7 Uso de esponjeamento na segurança do alimento

Amostragens em superfícies para quantificação de microrganismos podem ser realizadas com o uso de esponjas e swab. Este procedimento tem o objetivo de recuperar o maior número possível de unidades formadoras de colônias, não destruindo a superfície amostrada.

Esponjas são muito absorventes em comparação com swabs e são vantajosas para a amostragem de um maior volume e área de superfície. No entanto, todas as bactérias que são removidas da superfície durante a amostragem tendem a tornar-se aprisionadas dentro da matriz da esponja (CLEMONS, 2010).

Clemons (2010) descreve que swabs possuem uma haste de madeira ou plástico, e vários tipos de cabeça, tal como poliéster, rayon, algodão, fibras de alginato e Dacron. Para seu uso existe uma grande variedade de diluentes disponíveis para a recuperação das bactérias

e/ou neutralizar os desinfectantes residuais presentes na amostra. Procedimentos comuns para coleta de amostras envolvem o esfregamento da área designada com swab umedecido e depois, retorna-se o dispositivo para o tubo de ensaio contendo diluente.

Não há trabalhos sobre esponjeamento de vegetais antes da colheita. Há trabalhos com carcaças em abatedouros (LINDBLAD, 2007), determinação de contaminações em instalações de produção de queijos (CAGRI-MEHMETOGLU *et al*., 2011); em instalações de vegetais minimamente processados (LEHTO *et al.*, 2011); em hospitais (HEDIN, RYNBÄCK, LORÉ, 2010; THOM, 2012). Lewandoswski *et al.* (2010) e Clemons (2010) compararam métodos de amostragem para diversas superfícies de equipamentos inoculando artificialmente microrganismos.

Hedin, Rynbäck e Loré, (2010) discorreram sobre a eficiência de diversos métodos de esponjeamento na área de saúde. Não existe nenhum método normalizado para amostragem de superfícies e, normalmente, swabs são usados, mas a recuperação com algodão ou rayon foi baixa e um novo tipo de esfregão de nylon obteve eficiência de recuperação de inóculo maior que swabs.

Crawford e Musselman (2012) detectaram resíduos de pesticidas com uso de swabs de algodão e de poliéster para recuperação de resíduos em superfícies áspera ou lisa de vários produtos vegetais. As soluções continham níveis 10 e 100 vezes abaixo da tolerância estabelecida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EUA EPA).

Lewandowski (2010) concluiu que esfregar com uma esponja de espuma foi mais eficiente que swabs de poliéster na recuperação de esporos em superfícies contaminadas e que a esponja é confiável na amostragem de superfícies. Clemons (2010) relatou que esponjas são usadas de forma semelhante ao swabs, sendo vantajosas para a amostragem de grandes áreas de superfície, aumentando a

probabilidade de captura de microrganismos patogênicos que são preocupantes mesmo em baixo número, como *L. monocytogenes* e *E. coli* O157: H7.

Para o monitoramento de baixo número de enterobactérias e de *E. coli*, em carcaças de suínos, em matadouros suecos, a amostragem por esponjeamento de uma área relativamente grande foi superior à excisão de uma área menor (LINDBLAD, 2007).

De modo geral, o swab de poliéster foi menos eficiente entre quatro métodos de recuperação para a avaliação quantitativa ou qualitativa dos microrganismos patogênicos ou deterioradores, independentemente do tipo de superfície de equipamentos de processamento, da área de superfície ou nível de contaminação, no trabalho conduzido por Clemons (2010).

O método de swab pode ser mais atraente para muitos, por que é menos caro, não requer a utilização de equipamentos especializados (por exemplo, um Stomacher), e é mais fácil implementar no que diz respeito à amostragem. Apesar destas vantagens, o método da esponja abrange uma maior área de superfície e pode ter benefícios teóricos em comparação com o método de recuperação de zaragatoa (uso de swab) (THOM *et al*., 2012).

1.8 Imagem de superfície vegetal

O uso de imagens de superfícies de vegetais para verificar a eficiência da sanitização de vegetais tem sido aplicado em alguns trabalhos (KOSEKI *et al.,*2001; SHAW *et al.,* 2008; GOMES *et al.,* 2009). As imagens foram realizadas com procedimentos que se utilizam de glutaraldeído para fixar as células dos microrganismos patogênicos na superfície da folha, após lavagem da superfície do material usado com solução tampão fosfato e álcool. As imagens mostram, com bastante ênfase, o incrustamento de patógenos mesmo após tratamento com

sanitizantes, especialmente na sub-câmara dos estômatos e ao redor deles, assim como em fissuras.

Shaw *et al.* (2008), com o uso de imagens, concluíram que *E. coli* enterohemorrágica e não hemorrágica usam filamentos como principal meio de aderência sobre a epiderme de folhas de alface, sendo o mesmo mecanismo que a bactéria utiliza para colonizar o intestino de mamíferos, mas ao colonizar a filosfera e entrar na folha não causa doença, comportando-se como uma epífita oportunista que usa a folha como vetor.

1.9 Embalagem e comportamento do consumidor

Pesquisas indicam que a porcentagem de consumidores que decide suas compras no ponto de venda é de 70% e o tempo médio de observação de uma determinada categoria de produtos pode ser de apenas dez segundos. Numa gôndola observada pelo consumidor, mais de um terço dos produtos são totalmente ignorados (SALMASI e MARTINELLI, 1998). Considerando estas informações verifica-se a importância da aparência da embalagem e das informações nela contidas no processo de decisão de compra de um produto.

A marca tem sido citada como o mais importante fator que afeta a decisão de compra de produtos alimentares, sendo vista como a garantia de qualidade do produto, no qual o consumidor coloca suas expectativas e confiança (VARELA *et al.*, 2010).

Salmasi e Martinelli (1998) reportam que 88% das donas de casa brasileiras possuem como exigência principal a marca do produto, 87% consideram imprescindível o telefone do Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC) e 82% querem a lista dos ingredientes. O nome do fabricante é procurado por 79% das entrevistadas, o endereço do fabricante, por 76%, e 51% das donas de casa prefere ver a foto do produto.

Os resultados obtidos em um estudo sobre aceitação de sobremesa láctea mostraram a relevância das características da embalagem como cor e formato na criação de expectativas sensoriais nos consumidores, podendo afetar a percepção e aceitação do produto (ARES e DELIZA, 2010a). Além disso, ARES *et al.(*2010) também verificaram que a presença de imagem do creme do produto no rótulo de sobremesa láctea influenciou positivamente o consumidor.

As características mais importantes na embalagem foram: formato e cor, design do rótulo e as informações mais importantes foram: data de validade, marca e informação nutricional (ARES e DELIZA, 2010 b).

Staniewska, Kuncewicz e Mieczkowska, (2010) verificaram que a fundamental razão pela qual as pessoas são interessadas em informação nutricional é o cuidado com a saúde. Quase metade dos respondentes concordou com isso, e as informações mais importantes do rótulo apresentadas nesse trabalho foram: prazo de validade, nome e marca do produto e a informação de como utilizar o produto.

No Brasil, segundo o decreto 6323, de 27 de dezembro de 2007, art. 30, parágrafo único, o produto orgânico deve identificar o sistema de certificação, se é auditoria ou sistema participativo de garantia. Essa legislação não obriga a presença do selo da entidade certificadora junto ao selo oficial, quando se trata de sistema de certificação (BRASIL, 2007a).

Os produtos orgânicos devem ser facilmente reconhecidos pelos consumidores. Neste sentido, a Instrução normativa nº 19, de 28 de maio de 2009, instituiu no seu artigo 2, item X, o selo do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, como sendo a marca visualmente perceptível que identifica e distingue produtos controlados no Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, bem

como garante a conformidade dos mesmos com os regulamentos técnicos da produção orgânica (BRASIL, 2009a).

Na Europa, desde julho de 2010, todos os produtos orgânicos devem ter o novo selo oficial da União Européia, mas há muitos selos de certificadoras orgânicas em vários países europeus. Janssen e Hamm (2012) tentaram elucidar porque consumidores preferem certas logomarcas para produtos orgânicos que outras, entrevistando 2441 consumidores em seis países da Europa. Os resultados demonstram que a escolha por selos orgânicos tem natureza subjetiva e não objetiva. Além disso, poucos consumidores confiam em produtos rotulados como orgânicos sem a logomarca oficial, e certas logomarcas de certificadoras orgânicas são mais importantes para os consumidores que a logomarca oficial, em alguns países.

Dantas *et al.* (2005) observaram que consumidores pagariam mais pela couve sem produtos químicos e não pagariam mais pela couve orgânica, revelando que o termo orgânico não é bem compreendido pelos consumidores, apesar do alto grau de instrução (81% com nível superior). Os autores concluíram claramente que há necessidade de informar e orientar o consumidor sobre o significado de produto orgânico, ressaltando suas vantagens e características.

Os produtos oriundos da agricultura orgânica são relativamente recentes no contexto brasileiro com consumidores fiéis, que não se consideram *experts* no assunto e confiam nos atributos deste tipo de alimento. Um processo mais transparente de comercialização, que facilite o acesso do consumidor às informações sobre os produtos orgânicos, pode ajudar na ampliação do mercado brasileiro (HOPPE, 2012).

Atributos sócio demográficos são frequentemente usados para segmentação de consumidores, devido sua simplicidade e mensuração, mas Hoppe (2012) observou que as variáveis sócio

demográficas não foram influentes na predição do consumo de produtos orgânicos. A maior desvantagem é sua limitada relevância em prognósticos do comportamento do consumidor. Em contraste, alguns autores inferem que o estilo de vida e avaliações psicológicas oferecem oportunidades promissoras com respeito à segmentação de mercados, baseados nas afirmações referentes a aspectos, como por exemplo, preferência de produtos e atividades no período de lazer (SPARKE e MENRAD, 2011).

Em pesquisa realizada pela FIESP e IBOPE (2010), nos principais centros consumidores do Brasil, 21% dos entrevistados se declararam pertencer ao grupo de consumo de alimentos denominado "Saudabilidade e Bem Estar - Sustentabilidade e Ética"; ao mesmo tempo, 29% declararam que pagariam mais por alimentos produzidos por técnicas sustentáveis.

Os resultados corroboram outros estudos da área que encontraram a existência de diferenças demográficas vinculadas às atitudes frente ao consumo de produtos orgânicos, porém sem valor significativo para explicar o comportamento. Onozaka e Mcfadden (2011) exploraram o aumento do uso de rótulos com diferentes apelos à sustentabilidade: Orgânico, Comércio Justo e Pegada de Carbono. Os consumidores avaliaram com maior importância produtos locais (onde a pegada de carbono é menor), seguido de certificação de Comércio Justo; o apelo importado, com maior pegada de carbono foi mitigado pela informação orgânico ou Comércio Justo.

Para a questão de segurança do alimento, o consumidor praticamente não possui informações suficientes e de forma simplificada. Uma das experiências de sucesso que pode se contrapor é o uso de "smiley", muito popular entre os consumidores e as empresas de alimentos dinamarquesas. Empresas que comercializam alimentos recebem inspeções sanitárias e o relatório advindo desta inspeção é

fixado em local de fácil acesso ao público. O relatório contém "carinhas" com diferentes expressões de alegre à triste, facilmente entendido pelo consumidor.

O uso de "smileys", desde 2001, provou ser eficaz no aumento da segurança do alimento na Dinamarca (DANISH VETERINARY AND FOOD ADMINISTRATION, 2013).

1.10 Técnicas sensoriais relacionadas ao estudo do comportamento de decisão de compra do consumidor

Conforme descrito anteriormente, o simples levantamento de dados sóciodemográficos nem sempre é útil para prever ou explicar o comportamento de decisão de compra dos consumidores. Técnicas projetivas como a associação de palavras e a aplicação de escalas de atitude, assim como a avaliação de escolhas do consumidor baseadas na técnica da *Conjoint Analysis*, podem, por outro lado, trazer informações relevantes quanto ao comportamento do consumidor em relação a um produto ou conceito.

Associação de palavras

Roininen, Arvola e La¨hteenma¨ki (2006) discutiram métodos qualitativos como ferramentas adequadas para revelar como os consumidores vêem e percebem novos conceitos. Técnicas de associação de palavras, que são comumente aplicadas em psicologia, são métodos qualitativos que servem como ferramentas para explorar a percepção dos consumidores para os novos conceitos. A associação de palavras pode ser menos trabalhosa do que muitos outros métodos qualitativos, como entrevistas pessoais. Mais importante ainda, técnicas associativas indiretas são capazes de captar aspectos afetivos menos conscientes dos entrevistados do que questionamentos mais diretos.

"Conjoint Analysis"

A *Conjoint Analysis* é utilizada com o objetivo de se entender a complexidade do processo de escolha e decisão de compra, denominada estrutura de preferência dos consumidores (SILVA e BASTOS, 2010).

O termo *Conjoint Analysis* pode ser traduzido como Análise Conjunta de Fatores (ANCF) ou Análise de Preferência Conjunta, sendo uma metodologia estatística muito utilizada em marketing e em estudos da preferência dos consumidores por bens materiais, alimentos, produtos, serviços e situações hipotéticas (SILVA E BASTOS, 2010).

Segundo Rezende (2003), a *Conjoint Analysis* surgiu da análise de atributos de Lancaster (1966), partindo da premissa que os consumidores avaliam um produto pela combinação de quantidades distintas de utilidade, proporcionais a cada um os atributos. O autor explica que é apresentado ao consumidor um conjunto de produtos hipotéticos, com diferentes combinações entre níveis de atributos, que os classifica de acordo com sua preferência. É uma técnica descritiva.

A *Conjoint Analysis* está baseada na hipótese que as complexas decisões, como as de compra, dependem não apenas de um único e sim de múltiplos atributos. Em *Conjoint Analysis*, a preferência do consumidor é decomposta a partir da avaliação de um conceito global de produto ou serviço. Esta abordagem é mais realista que a utilizada em pesquisas de marketing tradicional, pois está baseada na avaliação conjunta das diversas dimensões do produto ou serviço (BATTESINI e CATEN, 2005).

Na **Tabela 1** pode ser observada lista de atributos dos alimentos e atributos dos consumidores que afetam a tomada de decisão no consumo de alimentos elaborada por pesquisadores em 1965 e pode-se verificar que ainda são válidos tais critérios.

Tabela 1. Atributo dos alimentos e dos consumidores que exerceriam maior influência sobre a aceitação e seleção dos alimentos.

Atributos do alimento	Atributos do consumidor
Disponibilidade	Preferência regional
Utilidade	Nacionalidade, grupo étnico.
Conveniência	Idade e sexo
Preço	Religião
Uniformidade e confiabilidade	Educação, situação socioeconômica.
Estabilidade, necessidade de conservação.	Motivação psicológica: simbolismo do alimento e publicidade
Segurança e valor nutricional	Motivação fisiológica: sede, fome, deficiências, condições patológicas.
Propriedades sensoriais: aparência, aroma e sabor, textura e consistência, temperatura, dor.	

Fonte: Amerine, Pangborn e Roes (1965).

Apesar da Análise Conjunta de Fatores (ANCF) ser utilizada para a análise de mercado consumidor, apresentar ao consumidor todos os tratamentos e este escolher sua preferência é mais representativo no ambiente real de compra do que atribuir ranking para os produtos a serem avaliados. Esta metodologia é denominada *Choice Based Conjoint Analysis,* traduzida como Análise Conjunta de Fatores Baseada em Escolhas (ANCFE). As metodologias de ANCF se complementam com ANCFE, mas a ANFCE tem a vantagem de ser mais próxima do ambiente de compra (BASTOS, 2010).

Smolinski, Guerreiro e Raiher (2011) entrevistaram 100 pessoas e todas estavam dispostas a pagar, pelo menos, 10% a mais pelos produtos orgânicos; 70% pagariam 20% a mais; com valor acima de 50%, apenas 22% dos entrevistados estariam dispostos a pagar por produtos orgânicos, e apenas 8% estariam dispostos a pagar um percentual de 100% a mais. No mesmo trabalho, 59% dos entrevistados

têm nível superior completo e aceitam pagar 38,14% a mais pelos produtos orgânicos; em contrapartida, 10% dos entrevistados responderam que seu grau de instrução é de 1º ou 2º grau incompleto e estariam dispostos a pagar, no máximo, 10% a mais na substituição de produtos convencionais por produtos orgânicos. Dentre os motivos pelos quais se demandariam orgânicos está, de forma unânime, a preocupação com a saúde (100% dos entrevistados), vindo, na sequência, a preocupação com o meio ambiente (apenas 11%).

Soares, Deliza e Oliveira (2008) verificaram que vários fatores são determinantes no consumo de vegetais orgânicos: informação, preço, aparência e embalagem, mas os fatores informação e preço são mais importantes para os consumidores, independentemente do nível de renda, nível educacional e formação profissional.

Finalizando, o desafio que se apresenta ao pesquisador no planejamento de uma pesquisa de *Conjoint Analysis* é aproveitar as ferramentas de pesquisa de marketing e projetos de experimentos de forma a reduzir a complexidade e a quantidade de avaliações (esforço do respondente) sem diminuir a capacidade de modelar seu comportamento (BATTESINI e CATEN, 2005).

Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (ACP) é uma avaliação estatística multivariada, isto é, verifica as variáveis de forma conjunta. A ACP é uma análise exploratória de dados, prestando-se a gerar hipóteses. Os dados são analisados de forma a gerar novas variáveis em um espaço dimensional menor que três e assim possibilitar a percepção de informações que até então não eram possíveis de verificar em espaço com muitos eixos.

A ACP identifica as medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações e

transforma um conjunto original de variáveis em outro conjunto: os componentes principais (CP) de dimensões equivalentes. Essa transformação, em outro conjunto de variáveis, ocorre com a menor perda de informação possível, sendo que esta também busca eliminar algumas variáveis originais que possua pouca informação. Essa redução de variáveis só será possível se as variáveis iniciais não forem independentes e possuírem coeficientes de correlação não-nulos. A meta da análise de componentes principais é abordar aspectos como a geração, a seleção e a interpretação das componentes investigadas. Ainda pode determinar as variáveis de maior influência na formação de cada componente, que serão utilizadas para estudos futuros, tais como de controle de qualidade, estudos ambientais, estudos populacionais entre outros (VICINI, 2005).

A representação dos resultados é realizada no que se chama Círculo de Correlação Unitária, com nuvem de variáveis, com valores de 0 (zero) a 1 (um).

CATA (Check-all-that-apply)

Segundo Meyners, Castura e Carr (2013), a análise CATA é utilizada para verificar as percepções dos consumidores não treinados sobre uma variedade de atributos. Os dados para análise são organizados em uma matriz onde atributos marcados pelo consumidor recebe valor "1" e "0" indica que o atributo não foi escolhido. A análise é tipicamente considerada de natureza exploratória e descritiva. A análise gráfica é considerada como uma generalização da Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando-se os dois componentes principais mais relevantes.

Segundo Dooley, Lee e Meullenet (2010), essa metodologia resultou em boa concordância com perfis sensoriais descritivos, no caso de sobremesa. Além disso, os dados de atributo CATA aplicados ao mapeamento preferência foi semelhante para o mapa de preferência

externo, com a vantagem de ser uma tarefa simples e espontânea para os consumidores, quando comparado com respostas de taxas de intensidade.

Ares *et al.* (2014) concluem que 60 a 80 consumidores são suficientes para se obter configurações estáveis de resultados, para a técnica CATA.

Escala de atitude

A maioria das avaliações de atitude não está disponível em português, mas no caso da Escala de Atitude em Relação à Saúde, o questionário desenvolvido por Magnusson (2004) teve sua tradução realizada por Soares, Deliza e Gonçalves (2006). Seu objetivo é investigar a atitude do consumidor em relação à compra de alimentos orgânicos, com base na percepção das consequências ambientais e para a saúde, a partir da escolha de tais produtos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENAINEN, R. Improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science and Technology,** Kidlington, v. 7, n. 6, p. 179-187, June. 1996.

ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145–180, 2000.

ARENSTEIN, I. R. Dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa: coadjuvante tecnológico de alimentos. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 17, n. 107, p. 32-33, 2003.

ARES, G. et al. Relationship between involvement and functional milk desserts intention to purchase. Influence on attitude towards packaging characteristics. **Appetite,** Amsterdam, v. 55, p. 298-304, 2010.

Ares, G., Tárrega, A., Izquierdo, L., e Jaeger, S. R. Investigation of the number of consumers necessary to obtain stable sample and descriptor configurations from check-all-that-apply (CATA) questions. **Food Quality and Preference,** *31*, 135–141. doi:10.1016/j.foodqual.2013.08.012. 2014.

ARES, G.; DELIZA, R. 2010a. Studying the influence of package shape and colour on consumer expectations of milk desserts using word association and conjoint analysis**. Food Quality and Preference,** Kidlington, v. 21, p. 930-937, 2010.

ARES, G.; DELIZA, R. 2010 b.Identifying important package features of milk desserts using free listing and word association**. Food Quality and Preference,** Kidlington, v. 21, p. 621–628, 2010.

ARUSCAVAGE, D.; PHELAN, L.; LEJEUNE, J. T. Impact of changes in sugar exudate created by biological damage to tomato plants on the persistence of Escherichia coli O157:H7. **Journal of Food Science,** Hoboken, v. 75, n. 4, p. 187-192, 2010.

BAKER, C. M. et al. Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. 2010. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** Ribeirão Preto, v. 43, n. 8, p. 698-704, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500060>. Acesso em: 13 jul. 2012.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas. **FAO Agricultural Services Bulletin**, Lanham, n. 149, 99 p. 2003. Disponível em:<http://www.fao.org/docrep/005/Y4358E/Y4358E00.HTM>. Acesso em: 08 abr. 2013.

BASTOS, F. S. **Análise conjunta de fatores baseada em escolhas:** estimação e inferências. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

BATTESINI, M.; CATEN, C. S. Análise conjunta com estimulação em duas etapas. **Produto e Produção**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 31-51, 2005.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 145–172, 1995.

BEATTIE, G. A.; LINDOW. S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 353–359, 1999.

BERGER, C. N. et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology,** West Sussex, v. 12, n. 9, p. 2385-2397, 2010.

BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 2, p. 204-216, 1996.

BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 10, p. 808-814, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. 1999a. **Resolução 150/1999, de 28 de maio de 1999**. Autoriza a inclusão do acido dicloroisocianúrico e seus sais de sódio e potássio para desinfecção de água para consumo humano.Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, mai. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 1999 b. **Instrução normativa nº 7 de 29 de maio de 1999**. Estabelece as normas de produção para os produtos orgânicos de origem vegetal e animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 maio 1999. Seção 1, p. 11.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Lei nº 710.831, de 23 de dezembro de 2003.** Dispõe sobre a agricultura orgânica e da outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 2, de 8 de janeiro de 2004.** Dispõe sobre a relação de substâncias químicas de referências certificadas. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 jan. 2004. Seção 1, p. 28.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2007a. **Decreto nº 6323, de 27 de dezembro de 2007,** regulamenta a Lei 10.831 que dispõe sobre agricultura orgânica. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 de dezembro de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde . 2007b. **RDC nº 14,de 28 de fevereiro de 2007,** aprova o regulamento técnico para saneantes, Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 fevereiro 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009a. **Instrução Normativa nº 19,de 28 de maio de 2009,** aprova os mecanismos de controle e informação da qualidade orgânica dipostos no anexo I. Brasília, DF, 28 maio 2009. <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_019_de_28-05-2009.pdf> Acesso em:13fev. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009b. **Instrução Normativa nº 18,** de 28 Regulamento técnico para o processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 maio 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011a. **Instrução Normativa nº 24,** de 01 de junho de 2011, acrescidos na tabela do Anexo III (Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia Permitidos no Processamento de Produtos de Origem Vegetal e Animal Orgânicos). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 01 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011b. **Instrução Normativa nº 46,de 6 de outubro de 2011,** estabelece o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção. Brasília, DF, 6 de outubro de 2011. <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_046_de_06-10-2011.pdf> Acesso em:13fev. 2014.

BUCHHOLZ, U. et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. **New England Journal of Medicine,** Boston, v. 365, n. 19, 2011. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1106482>. Acesso em: 08 abr. 2013.

CAGRI-MEHMETOGLU, A. et al. Incidence of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in two Kasar Cheese processing

environments. **Food Control**, Kidlington, v. 22, n. 5, p. 762–766, 2011. doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.011.

CEAGESP. **Dados de comercialização**. 2010. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/comunicacao/arquivo/2011/fevereiro/180211/view?searchterm=volume%20comercializa%E7%E3o> Acesso em: 08 abr. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport infections linked to cantaloupe (final update).** 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/index.html>. Acesso em: 07 mar. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **New vital signs**: listeria food poisoning striking hard at nation's most vulnerable. 2013. Disponível em:<http://www.cdc.gov/media/dpk/2013/dpk-vs-listeria-striking-hard.html>. Acesso em: 16 dez. 2013.

CLEMONS, J. A. **Novel approaches for the efficient sampling and detection of listeria monocytogenes and brochothrix thermosphacta on food contact surfaces**. Tennessee: University of Tennessee, 2010. Disponível em: <http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/784>. Acesso em: 05 mar. 2012.

COMETTI, N. N. et al. Composto nitrogenado e açucares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 748-753, 2004.

COOLEY, M. B.; CHAO, D.; MANDRELL, R. E**.** *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. **Journal of Food Protection,** Des Moines, v. 69, n. 10, p. 2329-2335, 2006.

CRAWFORD, E.; MUSSELMAN, B. Evaluating a direct swabbing method for screening pesticides on fruit and vegetable surfaces using Direct Analysis in Real Time (DART) coupled to an exactive benchtop orbitrap mass spectrometer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 403, n. 10, p. 2807–12, 2012. doi:10.1007/s00216-012-5853-6.

DANGOUR, A. D. et al. Nutritional quality of organic foods: a systematic review **American Journal of Clinical Nutrition,** Bethesda, v. 90, n. 3, p. 680-685, 2009.

DANISH VETERINARY AND FOOD ADMINISTRATION. 2013. Disponível em: <http://www.findsmiley.dk/en-US/Forside.htm>. Acesso em: 16 nov. 2013.

DANTAS, M. I. S. et al. Couve minimamente processada: intenção de compra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 762-767, 2005.

DAROLT, M. R. **Comparação entre a qualidade do alimento orgânico e convencional**. In: Instituto Agronômico do Paraná, 2003. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/OrgConvenc.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2013.

DEERING, A. J.; MAUER, L. J.; PRUIT, R. E. Internalization of E. coli O157:H7 and Salmonella spp. in plants: a review**. Food Research International,** Kidlington, v. 45, p. 567–575, 2012.

DOOLEY, L.; LEE, Y.; MEULLENET, J. F. The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. **Food Quality and Preference**, *21*(4), 394–401. 2010.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção 2.** 2. ed. Seropédica, RJ: Embrapa, 2006.

EMBRAPA. **Perfil do consumidor e do consumo de produtos orgânicos no Rio Grande do Norte**. Aracajú, SE: Embrapa, 2007. Documentos 125, 2007.

EMBRAPA. **Alface**. 2012. Disponível em: < http://www.cnph.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/alface.htm>. Acesso em: 23 abr. 2013.

ERICKSON, M.C. et al. 2010a. Surface and internalized *Escherichia coli* O157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spraycontaminated irrigation water. **Journal of Food Protection,** Des Moines, v. 73, p. 1023-1029, 2010.

ERICKSON, M.C. et al. 2010b. Infrequent internalization of Escherichia coli O157:H7 into field-grown leafy greens. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, p. 500e506, 2010.

FERREIRA, E. **Avaliação de diferentes tratamentos de desinfecção de alface**: uma abordagem química e toxicológica. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, 2009. Disponível em:< http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/62572>. Acesso em: 18 ago. 2013.

FIESP. **Pesquisa Nacional FIESP/IBOPE sobre o perfil do consumo de alimentos no Brasil**. São Paulo: FIESP, 2010. Disponível em: <http://www.abic.com.br/media/EST_PESQFoodTrendsl.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2013.

FORMAN, J.; SILVERSTEIN, J. Organic foods: health and environmental advantages and disadvantages**. Pediatrics**, Philadelphia, online, Oct. 2012. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/content/early/2012/10/15/peds.2012-2579.abstract > Acesso em: 08 abr. 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo. Atheneu. 2005.

GIL, M. I. et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 134, p. 37-45, 2009.

GOMES, C. et al. Understanding E . coli internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 135, n. 3, p. 238–247, 2009. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.026.

GOPAL, A. et al. Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 210–9, 2010. doi:10.1016/j.fm.2009.10.006

HEDIN, G.; RYNBÄCK, J.; LORÉ, B. New technique to take samples from environmental surfaces using flocked nylon swabs. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 75, n. 4, p. 314–7, 2010. doi:10.1016/j.jhin.2010.02.027.

HOPPE, A. et al. Comportamento do consumidor de produtos orgânicos: uma aplicação da teoria do comportamento planejado. **BASE - Revista de Administração e Contabilidade da Unisinos**, São Leopoldo, v. 9, n. 2, p. 174–188, 2012. doi:10.4013/base.2012.92.06.

HOREV, B. et al. The effects of active and passive modified atmosphere packaging on the survival of Salmonella enterica serotype Typhimurium on washed romaine lettuce leaves. **Food Research International**, Kidlington, v. 45, n. 2, p. 1129–1132, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.037

IBGE. **Censo agropecuário**: Brasil, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf> Acesso em: 08 abr. 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Improving food safety through a one health approach.** Washington. DC: National Research Council, The National Academic Press, 2012. 418 p. Disponível em: <http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=13423&page=R2>. Acesso em: 08 abr. 2013.

JANSSEN, M.; HAMM, U. Product labelling in the market for organic food: consumer preferences and willingness-to-pay for different organic certification logos. **Food Quality and Preference**, Kidlington, v. 25, p. 9-22, 2012.

KIM, J.G.; YOUSEF, E. and DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 9, p. 1071- 1087, 1999.

KOSEKI, S.; YOSHIDA, K.; ISOBE, S.; ITOH, K. Decontamination of Lettuce Using Acidic Electrolyzed Water. **Journal of Food Protection,** Des Moines, v. 64, n. 5, p. 652–658, 2001.

KROUPITSKI, Y. et al. Internalization of Salmonella enterica in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. **Appl. Environ. Microbiol.** 75(19):6076, 2009.

LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S. C. e STRUIJK, C. B. Advances In The Bacteriology Of The Coliform Group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. **Annual Review Microbiology,** Palo Alto, v. 55, p. 201–234, 2001.

LEHTO, M. et al. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. **Food Control,** Kidlington, v. 22, p. 469-475, 2011.

LEITÃO, M. F. et al. Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface. **Boletim do ITAL**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 201-226, 1981.

LEVEAU, J. Life on leaves. **Nature**, *461*(October), pg 741. 2009

LEWANDOWSKI, R. et al. Use of a foam spatula for sampling surfaces after bioaerosol deposition. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 76, n. 3, p. 688–94, 2010. doi:10.1128/AEM.01849-09

LI, H., TAJKARIMI, M., e OSBURN, B. I. Impact of vacuum cooling on Escherichia coli O157:H7 infiltration into lettuce tissue. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. *74, n.* 10, p. 3138–3142, 2008. doi:10.1128/AEM.02811-07

LINDBLAD, M. Microbiological sampling of swine carcasses: a comparison of data obtained by swabbing with medical gauze and data collected routinely by excision at Swedish abattoirs. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 118, n.2, p. 180–185, 2007. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.009.

LINDQVIST, K. B. In the origin of cultivated lettuce. **Hereditas**, Malden, v. 46, p. 319-350, 2010. doi:10.1111/j.1601-5223.1960.tb03091.x.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F. et al. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. **Food Microbiology,** London, v. 27, p. 199-204, 2010.

LUO, Z. et al. Quantitative real time measurements of bacteria: bacteriophages interactions in fresh lettuce leaves. **Journal of Food Engineering**, London, v. 11, n. 1, p. 176–185, 2012. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.12.025.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P. A.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica,** vol. 1, p. 89-111, 2004.

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**, Gaithersburg, v. 78, n. 2, p. 391-397, 1995.

MEYNERS, M.; CASTURA, J. C.; CARR, B. T. Existing and new approaches for the analysis of CATA data. **Food Quality and Preference,** *30*(2), 309–319. doi:10.1016/j.foodqual.2013.06.010. 2013.

MELOTTO, M. et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell,** Cambridge, v. *126, n.* 5, p. 969–80, 2006. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054.

MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. São Carlos: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p.

MOYNE, A. L. et al. Fate of Escherichia coli O157:H7 in field-inoculated lettuce. **Food Microbiology,** London, v. 28, p. 1417-1425, 2011.

NIEMIRA, B. A.; COOKE, P. H. Escherichia coli O157:H7 biofilm formation on Romaine lettuce and spinach leaf surfaces reduces efficacy of irradiation and sodium hypochlorite washes. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 75, n. 5, p. 270–277, 2010. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01650.x.

NUNES, G. L. 2010. **Diversidade e estrutura de comunidades bacterianas na filosfera e suas relações com a espécie vegetal e compostos orgânicos voláteis**. 2010. 110 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2010.

OLAIMAT, A. N.; HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. **Food Microbiology**, London, v. 32, p. 1-19, 2012.

OLIVEIRA, M. A. **Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, Salmonella sp e Listeria Monocvtogenes por métodos convencias e aplicação de PCR em tempo real de quantificação de L. monocytgenes.** 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

OLIVEIRA, M. et al. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology,** London, v. 27, p. 679 – 684, 2010.

OLMEZ, H.; TEMUR, S. D. Effects of diferente sanitizing treatments on biofilms and attchment of Escherichia coli and Listeria monocytogenes on green leaf lettuce. **Food Science and Techonology,** London, v. 43 p. 964-970, 2010.

ONOZAKA, Y.; McFADEN, D. T. Does Local labeling complement or compete with other sustainable labels? a conjoint analysis of direct and joint values for fresh produce claims. **American Journal of Agricultural Economics**, Cary, v. 93, n. 3, p. 693-706, 2011.

PHILLIPS, C. A.; HARRISON, M. A. Comparison of the microflora on organically and conventionally grown spring mix from a California processor. **Journal of Food Protection,** Des Moines, v. 68, n. 6, p. 1143–1146, 2005.

RASTOGI, G. et al. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. **The ISME Journal**, London, v. *6, n.* 10, p. 1812–22, 2012. doi:10.1038/ismej.2012.32.

REIS, V. M. **Interação entre plantas e mircrorganismos**. Seropedica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 24 p. (Documentos, 194).

REZENDE, C. L. **A coordenação do sistema agroindustrial do tomate orgânico no estado de São Paulo e o comportamento do consumidor**. 2003. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Programa Interunidades em Nutrição Humana Aplicada FSP/FCF/FEA, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ROININEN, K.; ARVOLA, A.; LIISA LÄHTEENMÄKI, L. Exploring consumers perceptions of local food with two different qualitative techniques: laddering and word association. **Food Quality and Preference**, Kidlington, v. 17, p. 20–30, 2006.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira,** Brasília, v. 30, p. 187-194, 2012.

SALDAÑA, Z. et al. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxigenic Escherichia coli O157:H7. **Frontiers in microbiology,** Lausanne, v. 2. art.119, 2011.

SALMASI, S. V.; MARTINELLI, D. P. Embalagens: relacionando produto, empresa, mercado e a comunicação com o consumidor. In: SEMINÁRIOS EM ADMINISTRAÇÃO FEA/USP, 3., 1998. **Anais...** São Paulo: SEMEADFEA/USP, 1998.12 p.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococus em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SCHARFF, R. Health-related costs from foodborne ilness in the United State**. Produce Safety Project**, Washington, 2010. 28 p. Disponível em: <http://www.pewhealth.org/uploadedFiles/PHG/Content_Level_Pages/Reports/PSP-Scharff%20v9.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2013.

SEBRAE. **Hortaliças minimamente processadas**: estudos de mercado. SEBRAE/ESPM, 2008. 40 p.

SEBRAE. **Horticultura**. 2012. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/horticultura/o-setor/processamento-minimo-de-hortalicas/o-que-e>. Acesso em: 09 abr. 2013

SHAW, R. K., BERGER, C. N., FEYS, B., KNUTTON, S., PALLEN, M. J., e FRANKEL, G. Enterohemorrhagic Escherichia coli Exploits EspA Filaments for Attachment to Salad Leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, *74*(9), 2908–2914. 2008. doi:10.1128/AEM.02704-07

SILVA, C. H. O.; BASTOS, F. S. Introdução a conjoint analysis. In: IX ENCONTRO MINEIRO DE ESTATÍSTICA, 9., 2010. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, MG, 2010. (Minicurso).

SMOLINSKI, R.; GUERREIRO, E.; RAIHER, A. Análise do mercado de produtos orgânicos: estudo de caso de feira em Ponta Grossa, PR. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, n. 23, p. 167-182, jan./jun. 2011. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/made/article/view/20802/14464>. Acesso em: 23 jul. 2011.

SOARES, L.L.S.; DELIZA, R.; GONÇALVES, E. B. Escalas atitudinais utilizadas em estudos de consumidor: tradução e validação para a língua portuguesa. ***Alimentos e Nutrição***, *17*(1), 51–64. 2006. <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/211> Acesso em: 12fev.2014.

SOARES, L. L. S.; DELIZA, R.; OLIVEIRA, S. P. The Brazilian consumer's understanding and perceptions of organic vegetables: a focus group approach. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 241-246, 2008.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003.

SPARKE, K.; MENRAD, K. Food consumption style determines food product innovations' acceptance. **Journal of Consumer Marketing,** *28*(2), 125–138. 2011. doi:10.1108/07363761111115962

STANIEWSKA, K.; KUNCEWICZ, H. P.; MIECZKOWSKA, M**.** Contemporary food labelling and its role in consumer's education. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON FOOD INOVATION, 2010, Valencia. **Abstracts…** Valencia, 2010. Disponível em: <http://www.foodinnova.com/foodInnova/docu2/342.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2013.

TEPLITSKI, M. et al. Functional genomics studies shed light on the nutrition and gene expression of non-typhoidal Salmonella and enterovirulent E. coli in produce. **Food Research International**, Kidlington, v. 45, n. 2, p. 576–586, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.020.

THOM, K. A, et al. Comparison of swab and sponge methodologies for identification of Acinetobacter baumannii from the hospital environment. **Journal of Clinical Microbiology,** *50*(6), 2140–1. 2012. doi:10.1128/JCM.00448-12

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8 ed. 2012. 934p.

VARELA, P. et al. Influence of brand information on consumers' expectations and liking of powdered drinks in central location tests. **Food Quality and Preference**, Kidlington, v. 21, p. 873-880, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.05.012.

VENNERIA, E.; NARINELLIB, L.; INTORREA, F.; FODDAIA, M. S.; AURIGEMMAB, C.; DURAZZOA, A.; MAIANIA, G. e GIUSTIB, M. D. Effect of harvest time and minimal processing on nutritional and microbiological quality of three leaf crops. **Journal of Agriculture and Biodiversity Research**. Volume 1, Issue 1, pp 11-17; April 2012

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. 215 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS (FAO). Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables. In: WHO; FAO. **Microbiological risk assessment series**: pre-publication version. Geneva: WHO, FAO, 2008. 38 p. Disponível em:<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_FruitVeges.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2013.

YURI, J. E. et al. Efeito de composto orgânico sobre a produção e características comerciais de alface americana**. Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 127-130, 2004.

ZHANG, G.; MA, L.; BEUCHAT, L. R.; ERICKSON, M. C.; PHELAN, V. H.; DOYLE, M. P. Lack of internalization of Escherichia coli O157:H7 in lettuce (Lactuca sativa L.) after leaf surface and soil inoculation. **Journal of Food Protection,** *72*(10), 2028–37. 2009.

ZERDAS, E. R. M. A. **Avaliação do uso de surfactantes na remoção de *Salmonella Enteridis* aderida em superfície foliar de alface**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. 58 f.

CAPÍTULO II

Uso de esponjeamento para a rastreabilidade de patógenos humanos em alface orgânica

RESUMO

RIZZO, D. L. **Uso do esponjemanto para rastreabilidade de patógenos humanos em alface orgânica.** Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Hortaliças podem se constituir em veículos de patógenos humanos, especialmente *Escherichia coli* e *Salmonella sp.,* agentes causais de surtos alimentares mais frequentes associados a vegetais. Quando se utiliza cultivo orgânico, insumos biológicos substituem produtos químicos e pode haver maior possibilidade de contaminações. Ao mesmo tempo, microrganismos associados às plantas podem ser antagonistas aos patógenos humanos. Normalmente, a contaminação e a descontaminação são expressas em número de unidades formadoras de colônias (UFC) por peso de produto, mas a determinação da contaminação da superfície de folhas pode ser mais realista para hortaliças frescas, visto que a sanitização não atinge patógenos internalizados na planta. Amostrar superfície amplia a probabilidade de localizar patógeno cujo comportamento é errático e a presença deste pode direcionar para a necessidade de medida corretiva apropriada. O trabalho teve os objetivos de identificar a microbiota presente sobre folhas de alface antes da colheita e rastrear possíveis pontos de contaminação nas propriedades rurais, utilizando esponjeamento. Para tal esponjas de celulose e swabs embebidos em água peptonada tamponada (APT) foram utilizadas para recuperar microrganismos sobre a superfície de folhas de alfaces antes da colheita e nos itens que entram em contato com a produção: mãos, caixas, bancadas e utensílio de colheita, em 10 propriedades rurais, totalizando 70 amostragens. Para as análises microbiológicas foram utilizadas metodologias da AOAC e avaliados os microrganismos mesófilos totais, psicrotróficos, Bolores e leveduras, *Listeria monocytogenes, Salmonella sp., Escherichia coli e Staphylococcus*

aureus. Os resultados microbiológicos demonstraram que a população de mesófilos é predominante sobre folhas de alface e nas superfícies amostradas. Detectou-se *E. coli* em superfície de folhas de alface em duas amostragens, em três superfícies de bancadas de manipulação e uma amostragem de caixas de colheita. A presença de *L. monocytogenes* foi detectada em quatro amostras para os seguintes itens: folha de alface, caixa, faca e bancada de manipulação de duas diferentes propriedades. Não foi detectada presença de *Salmonella sp*. em qualquer das coletas. Imagens em microscópio eletrônico de varredura revelam boa recuperação de microrganismos sobre folhas de alface utilizando a esponja.

Palavras chave: APPCC, filosfera, superfície, swabbing.

ABSTRACT

RIZZO, D. L. **Swabbing with sponge for traceability of human pathogens in organic lettuce.** Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Leaf vegetables can act as carriers of pathogens, especially *Escherichia coli* and *Salmonella sp*. Recent episodes reveal a growing number of outbreaks associated with this production. Organic cultivation inputs can increase contamination but, antagonistic microorganisms associated with the plants can control pathogens. Typically, the contamination and decontamination are expressed in number of CFU per product weight, but the determination of CFU on the surface leaves can be more realistic, since sanitizing does not reach pathogens internalized by the plant. This study aims to quantify the microbiota present on organic lettuce leaves before harvest and track possible points of contamination in farm environment. Cellulose sponges soaked in buffered peptone water were used to recover microorganisms on the surface of lettuce leaves before harvest and items that come in contact with the production: hands, boxes, benches and harvest utensils, in 10 farms. AOAC methods, including rapid methods for *Listeria monocytogenes, Salmonella sp. Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used. Microbiological results showed that the population is predominantly mesophilic on lettuce leaves and on the sampled surfaces. *E. coli* was detected in two samples of lettuce leaves, on three surfaces of handling benches and one sampling of harvest boxes. The presence of *L. monocytogenes* was detected in four samples for the following items: lettuce leaf, box, knife and handling bench of two different farms. *Salmonella sp*. wasn't detected in any collection. The sponge recovered microorganisms on surfaces, with good results, as shown by Scanning Electon Microscope images.

Key words: HACCP, phyllosphere, swabbing, sponge.

1. Introdução

Surtos alimentares são considerados problemas em saúde pública, pelo número pessoas afetadas e seus custos econômicos. Scharff (2010) estima que nos EUA, a cada ano, ocorrem 20 milhões de casos associados a frutas e hortaliças e o custo é de 38,6 bilhões de dólares por ano.

O aumento do consumo de frutas e vegetais, advindo de um sistema mais eficiente de distribuição de produtos frescos contribuiu para o aumento de doenças associadas a esta produção. Patógenos podem ser contaminantes antes da colheita e no pós-colheita, mas se ocorrerem é difícil a sanitização. Métodos de sanitização da superfície dos vegetais não são eficientes, e os patógenos de maior importância relatados nos surtos são *Salmonella sp. e E. coli* O157:H7 (BERGER *et al*., 2010; OLAIMAT e HOLLEY, 2012).

Devido à possibilidade de patógenos humanos se estabelecerem em alimentos, a rastreabilidade é critério básico na segurança do alimento, sendo utilizados vários métodos de registro de operações e insumos na fase de produção e vários métodos de coleta de amostras para verificação de segurança microbiológica.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), em produtos de origem vegetal, por exemplo, preconiza a amostragem de um quilo de produto do lote a ser analisado para verificação de *Salmonella sp.* Ressalta que a coleta de amostras é um procedimento técnico e constitui um dos principais elementos para se garantir a representatividade do resultado laboratorial (BRASIL, 2013).

Esta recomendação segue o *Codex Alimentarius*, criado pela FAO e pela OMS em 1963, para reger as normas internacionais de padrões alimentares, diretrizes e códigos para proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas justas no comércio de alimentos (WHO, 2014).

Uma das questões importantes é a grande variabilidade de sistemas de produção, processamento, transporte, comercialização e manipulação de alimentos, sendo a cadeia de alimentos, fonte farta de pontos de contaminações.

A distribuição errática de microrganismos patogênicos pode dificultar a tarefa de localizar os pontos críticos de controle (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2007). Localizar a contaminação de alimentos desde a produção pode aumentar a segurança do alimento.

Dentre as hortaliças, a alface (*Lactuca sativa L.*) é folhosa mais consumida no Brasil. Em algumas centrais de distribuição, o conjunto das variedades de alface representa quase 50% de todas as folhosas que são comercializadas e, dentre essas, a alface crespa corresponde a quase 40% do total (EMBRAPA, 2006).

Os sistemas de cultivo podem afetar a qualidade intrínseca de hortaliças. O sistema orgânico apoia-se em práticas conservacionistas de preparo do solo, rotações de culturas e consórcios, no uso da adubação verde e de controle biológico de pragas, com emprego eficiente dos recursos naturais (REIS, 2005). As premissas para a produção orgânica obedecem a Instrução Normativa nº46, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 6 de outubro de 2011 (BRASIL, 2011).

Os padrões microbiológicos para frutas e/ou hortaliças "frescas, *in natura*, preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto" contidos na Resolução RDC Nº12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelecem ausência de *Salmonella* em 25 g e contagem máxima de coliformes termotolerantes ou *E. coli* de 5.10^2 UFC.g^{-1} para frutas e 1.10^2 UFC.g^{-1} para hortaliças (BRASIL, 2001).

No entanto, o uso de amostragem de superfícies pode ser mais realista, pois sanitizantes não atingem certas regiões de folhas de vegetais. Microfotografias eletrônicas mostram que as células de *E. coli* ficam localizadas no estômato onde permanecem protegidas, explicando a baixa eficácia dos sanitizantes (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al*. 2010).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de esponjeamento de superfícies para localizar possíveis pontos de contaminação com microrganismos patogênicos ao homem, *Salmonella sp. e Listeria monocytogenes,* em folhas de alface orgânica, antes da colheita, em utensílios, nas mãos de manipuladores, nas bancadas e caixas de colheita, avaliando também a população de microrganismos indicadores de qualidade de vegetais.

3. Material e Métodos

3.1 Amostragem de plantas de alface no campo

A amostragem foi realizada em plantas de alface antes da colheita e pontos que entram em contato com a alface, quais sejam: caixas, bancadas, mão do manipulador e faca. As épocas de realização das amostragens foram janeiro de 2013 e agosto de 2013, sendo seis propriedades em janeiro e quatro propriedades em agosto.

As alfaces foram esponjeadas, sendo amostradas 10 plantas ao acaso e foi esponjeado o lado adaxial (superior) de três folhas de cada planta, com uma mesma esponja; portanto uma esponja representa a superfície de 30 folhas de alface. A foto na **Figura 1** ilustra o trabalho de amostragem de uma folha de alface no campo.

Figura 1. Esponjeamento de folhas de alface antes da colheita

A **Figura 2** apresenta a planta com a separação das porções de folhas de alface da parte externa, mediana e interna.

Figura 2. Folhas de alface: parte externa, mediana e interna da planta

A amostragem das superfícies de alface foi realizada com quatro esponjas para cada propriedade. Foram esponjeadas quatro grupos de

10 unidades de alface, separadamente. Este procedimento foi assim realizado para se obter duas repetições e pela necessidade do enriquecimento em meios específicos diferentes para *L. monocytogenes* e para *Salmonella sp.*

As três folhas esponjeadas estavam localizadas em cada terço da planta com o objetivo de amostrar as diferentes condições da planta: folhas internas tem menor probabilidade de entrar em contato com o solo quando comparada com as folhas inferiores; e para amostrar folhas com diferente composição e hidrofobicidade, conforme descrito em Zerdas (2009).

A amostragem de caixas e bancadas foi realizada com esponjeamento com moldes de 10x10cm. Foram amostrados 10 pontos para caixa e 10 pontos para bancada. Solicitou-se ao produtor ou encarregado que lavasse as caixas e bancadas como de costume, antes da amostragem.

A faca é o único utensílio utilizado na colheita e foi esponjeada toda a sua superficie.

A amostragem realizada nas mãos dos agricultores foi realizada após a solicitação que estes lavassem a mão como o fazem, costumeiramente. O swab foi passado na mão direita, na planta e costas das mãos e entre os dedos. A esponja foi passada na mão esquerda, na planta e costas da mão e entre os dedos. O uso de swab nas mãos é o método utilizado em indústrias alimentícias e neste caso foi inserido no estudo para comparação qualititiva com o esponjeamento.

As amostras foram mantidas em caixa térmica, com gelo, e transportadas para análise ao Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP, em Pirassununga/SP, dentro de 24 horas.

3.2 Análises microbiológicas

Foram utilizadas metodologias descritas pela Association of Analytical Communities (AOAC), onde os microrganismos alvos foram Mesófilos totais, Psicrotróficos, Bolores e Leveduras, *Listeria monocytogenes, Salmonella sp., Escherichia coli e Staphylococcus aureus.* Os métodos descritos foram realizados utilizando-se reagentes e meios de cultura de grau analítico.

As esponjas foram colocadas em sacos de amostragem estéreis nos quais foram adicionados 90 mL de água peptonada tamponada (APT) estéril e a seguir homogeneizadas em *Stomacher*, marca Marconi, modelo MA 440/CF, por 90 segundos. A partir desta diluição, considerada 10^{-2}, foram realizadas diluições decimais seriadas em 9 mL de APT, até 10^{-5}, nas quais foi analisada a presença dos microrganismos alvos.

Para o swab foi utilizado 9 mL de água peptonada tamponada (APT), agitado em vórtex, considerada 10^{-1} e realizadas diluições seriadas até 10^{-4}.

Após as diluições, procedeu-se a transferência para os meios apropriados e incubação de acordo com a metodologia específica para cada microrganismo alvo.

Quantificação de mesófilos totais e psicrotróficos

A análise foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura não seletivo, ágar padrão para contagem (PCA), com transferência de 0,1 mL das diluições e incubada a 35ºC± 2ºC/48h para mesófilos e 7ºC±2ºC/10 dias para psicrotróficos, de acordo com Silva, Junqueira e Silveira (2007).

Quantificação de bolores e leveduras

A análise foi realizada transferindo 0,1 mL das diluições em placas de Petri contendo dicloro rosa de bengal cloranfenicol (DRBC) e incubada a 25ºC±2ºC/3-5 dias de acordo com Silva, Junqueira e Silveira (2007).

Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*

O método de análise utilizado foi o Método Oficial AOAC nº 991.14. Foi realizada a transferência de 1 mL das diluições em placas Compact Dry "Nissui" EC, fabricada pela Nissui Pharmaceutical Company LTD, com certificação Micro Val. As placas foram incubadas a 35ºC±2ºC por 24 horas. Foram contadas, separadamente, as colônias vermelhas (características do grupo coliforme) e azuis (características de *E. coli*), conforme **Figura 3.**

Figura 3. Placa de compact dry, com colônias vermelhas (características do grupo coliforme) e azuis (característica de *E. coli*).
Fonte: http://www.hyserve.com/produkt.php?lang=pt&gr=1&pr=13

Não foi realizado isolamento para determinação de cepas patogênicas.

Quantificação de Staphylococcus aureus

O método de análise utilizou placa Petrifilm STX – *Staph Express Count System* (3M), Método Oficial AOAC nº 2003.11 (AOAC, 2007). Foi realizada a transferência de 1 mL da diluição no meio de cultura e incubada a 35ºC±2ºC por 24 horas. Foram contadas as colônias vermelho-violetas características, conforme **Figura 4**.

Figura 4. Petrifilm STX – *Staph Express Count System* e colônias vermelho-violetas características. Fonte: http://www.rodinsrl.com.ar/index.php?route=product/product&path=26&product_id=228

Quantificação de *Salmonella sp.*

Uma das mais recentes tecnologias na detecção de microrganismos patogênicos é o BAX® System da Dupont/Qualicon, baseado na automação das análises de alimentos por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Este sistema de análise permite a detecção rápida e sensível, eliminando várias etapas de subculturas. Como é baseado na análise de DNA pode ser considerado definitivo, não sendo necessário recorrer a provas bioquímicas ou imunológicas, o que não acontece com a maioria dos outros métodos. Amplifica uma sequencia de DNA não encontrada em outros gêneros de bactérias, e uma única cópia do DNA alvo pode ser ampliada em torno de 10^7 vezes em 2 a 3 horas (BAILEY, 1998).

Para verificar a presença de *Salmonella sp.* nas amostras coletadas foi utilizado o BAX® System, método oficial AOAC Official Method 2003.09 (AOAC, 2007) fabricado pela Du Pont Qualicon, validado pelo MAPA e certificado pela AOAC Research Institute sob nº 100.201. Os resultados são qualitativos (presença/ausência) e os procedimentos realizados de acordo com orientações do fabricante. A metodologia encontra-se descrita em Kushida (2005).

Foi realizado um pré-enriquecimento para as amostras em caldo lactosado, com incubação por 24 horas a 35ºC.

Quantificação de Listeria monocytogenes

Para verificar a presença de *Listeria monocytogenes* nas amostras coletadas foi utilizado o BAX® System da Du Pont. Os resultados são qualitativos (presença/ausência) e os procedimentos realizados de acordo com as orientações do fabricante (BAX® SYSTEM, 2014)

Foi utilizado o protocolo 24E, que prevê somente um pré-enriquecimento em caldo 24LEB e seu suplemento antibiótico, com incubação por 24 horas a 37ºC. Para amostras de 10 mL (esponja) foram utilizados 90 mL do meio de cultivo e para as amostras de 1mL (swab) foram utilizados 9 mL do cultivo.

3.3 Imagem de superfície de alface em microscópio eletrônico de varredura

Preparo da amostra para *imagem*

Seis folhas de alface foram escolhidas ao acaso, e três folhas foram esponjeadas com esponja de celulose umedecida em 10 mL de APT (água peptonada tamponada) estéril. Foram recortados três pedaços com cerca de 5x5cm de cada folha, totalizando três espécimes de cada tratamento (com e sem esponjeamento), para realizar imagem em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Foram fixadas estruturas com solução de glutaraldeido 3% em solução tampão fosfato pH 7, durante 2 horas, em placa de Petri. Após, os espécimes foram lavados três vezes com a solução tampão, seguido de banhos sucessivos em álcool (30%, 50%, 70%, 90%) por 10 minutos cada imersão e finalmente, imersão por três vezes no álcool 100%, também por 10 minutos cada vez. As amostras secaram durante a noite, em placa de Petri semiaberta, dentro da câmara de fluxo laminar que se encontrava fechada e desligada.

4. Resultados e discussão

4.1 Quantificação de microrganismos em alface

Na **Figura 5,** está apresentada a distribuição de microrganismos: mesófilos totais, psicrotróficos, bolores+leveduras, coliformes totais, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* presentes em uma folha alface, expressos em log UFC (logaritmo de unidades formadoras de colônias) por unidade (folha média de alface). Os resultados de cada produtor (P) estão numerados de 1 a 10 e R1 e R2 (repetição) representam os dois conjuntos de 10 pés de alface amostrados, conforme descrito no **item 3.1**.

Os resultados apontam a predominância da população de mesófilos (> 2.10^8 UFC/ folha média).

As amostras dos produtores 1 e 2 apresentam menores contagens. Um dos fatores que pode explicar este número é o uso de irrigação com mangueira, pois a força da irrigação, no dia anterior à colheita, pode ter reduzido a população microbiana na superfície da folha. A quantificação de coliformes totais esteve na ordem de 10^3 e não apresentou *E. coli*.

As populações de coliformes totais apresentaram contagens variadas. Segundo Rastogi *et al.* (2012), *Erwinia* e *Pantoea*, da família

Enterobacteriaceae são os coliformes reconhecidamente associados à alface e Leclerc *et al*. (2001) afirmam que organismos termotróficos do grupo coliforme são de origem ambiental, muito mais que de origem unicamente entérica, não sendo confiáveis como marcadores de presença de patógenos entéricos.

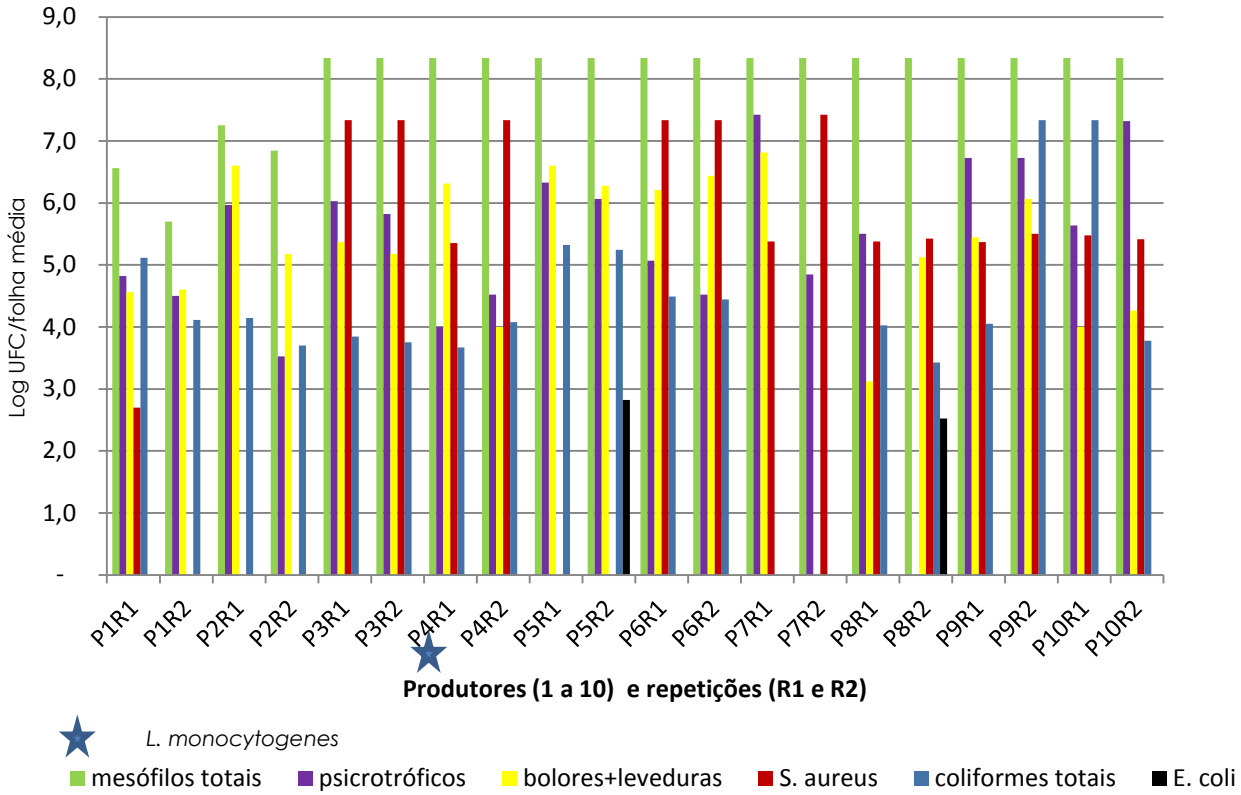


Figura 5. Contagem de microrganismos em folha de alface no campo

Foi dectado *E. coli* apenas nas amostragens dos produtores P5 e P8, com contagem na ordem de10^2 UFC/folha média de alface; para estas mesmas amostragens, as contagens de coliformes totais estiveram na ordem de 10^5 e 10^4 por folha, respectivamente. Apesar das contagens dos produtores P9 e P10 apresentarem as maiores resultados para coliformes totais (>2,0.10^7 UFC/folha média), não se detectou *E. coli*.

O estudo não realizou teste para verificação de patogenicidade de E. *coli* e a maior contagem de coliformes totais não previu sua presença, no caso das amostragens realizadas.

Em se tratando de cuidados no cultivo e cepas de *E. coli* patogênicas, Brandl (2008) verificou que em apenas 4 h após a inoculação e tratamento de folhas de alface com *E. coli* O157, a população aumentou 3,99; 4,54 e 11,05 vezes em folhas danificadas, cortadas e rasgadas, respectivamente, mas aumentou apenas 1,95 vezes em folhas intactas, sendo a população inicialmente igual. Assim, a colonização pelo patógeno foi correlacionada com a extensão do dano foliar. Este dado é importante, pois desde a condução da plantação no campo, deve-se favorecer a integridade foliar, como meio de evitar infecções com patógenos.

Uma preocupação importante com presença de patógenos e ausência de microrganismos espoliativos, seria o consumo de um vegetal contaminado, mas sem sintomas. Teplitski *et al.* (2012) verificaram que *Salmonella ou E. coli* O157: H7 não apresentaram sinais de doença na planta, mesmo em tomates colonizados com *Salmonella Typhimurium* (até 10^7 UFC/g), por cerca de 2 semanas à temperatura ambiente.

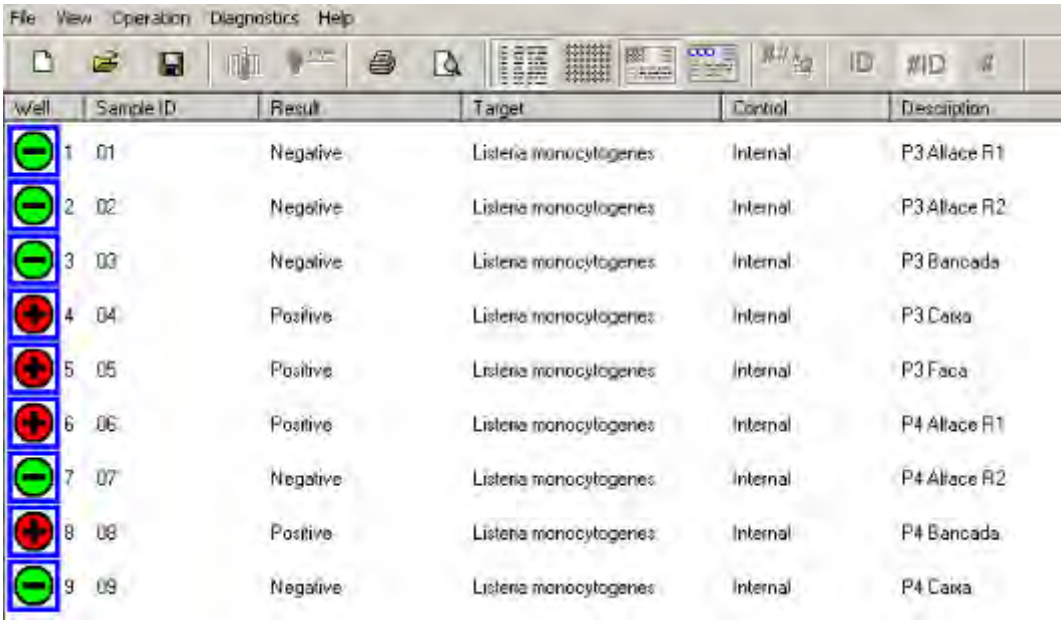
A presença ou a maior quantificação de outros microrganismos não pode prever a presença do microrganismo psicrotrófico patogênico *L. monocytogenes* nas alfaces (R1) do produtor P4, como se pode observar no resultado do Bax System **(Figura 6).** Para o mesmo campo de produção, que se trata de pequena área de produção, não ocorreu a presença na repetição R2, mesmo sendo plantas amostradas muito próximas, demonstrando o hábito errático do microrganismo.

Pode-se observar que duas coletas (P7 e P10) apresentaram maiores contagens psicrotróficos/folha média (> de $2{,}0.10^7$UFC/folha

média). Apesar da maior contagem, não houve a presença de *L. monocytogenes.*

Deste fato, Silva, Junqueira e Silveira (2007) recomendam que a amostragem deve contemplar um grande número de unidades de amostra, para uma avaliação mais precisa da extensão da contaminação por *L. monocytogenes.*

Tompkin (2002) sugere que, muito provavelmente, a melhor forma de proteger o consumidor seria estabelecer uma política que encorajasse frequente e agressivos testes para detecção de *Listeria*, seguida de ações corretivas.



File View Operation Diagnostics Help

Well	Sample ID	Result	Target	Control	Description
1	01	Negative	Listeria monocytogenes	Internal	P3 Alface R1
2	02	Negative	Listeria monocytogenes	Internal	P3 Alface R2
3	03	Negative	Listeria monocytogenes	Internal	P3 Bancada
4	04	Positive	Listeria monocytogenes	Internal	P3 Caixa
5	05	Positive	Listeria monocytogenes	Internal	P3 Faca
6	06	Positive	Listeria monocytogenes	Internal	P4 Alface R1
7	07	Negative	Listeria monocytogenes	Internal	P4 Alface R2
8	08	Positive	Listeria monocytogenes	Internal	P4 Bancada
9	09	Negative	Listeria monocytogenes	Internal	P4 Caixa

Figura 6. Imagem de tela do Bax System com as amostras positivas para *L. monocytogenes*

4.2 Quantificação de microrganismos em bancadas

As bancadas utilizadas pelos produtores normalmente se encontram a céu aberto, são construídas de vários materiais como plásticos ou telas, conforme apresentado na **Figura 7**.

Figura 7. Exemplo de bancada de tela na propriedade rural

As bancadas apresentaram contagens de mesófilos maiores que $6{,}5.10^6$UFC/cm^2 de superfície, para 8 produtores (exceção dos produtores 1 e 2), conforme **Figura 8.** Pode-se verificar que a bancada do produtor 6 apresentou a maior contagem de *S. aureus* e do produtor 10 apresentou a maior contagem de coliformes totais.

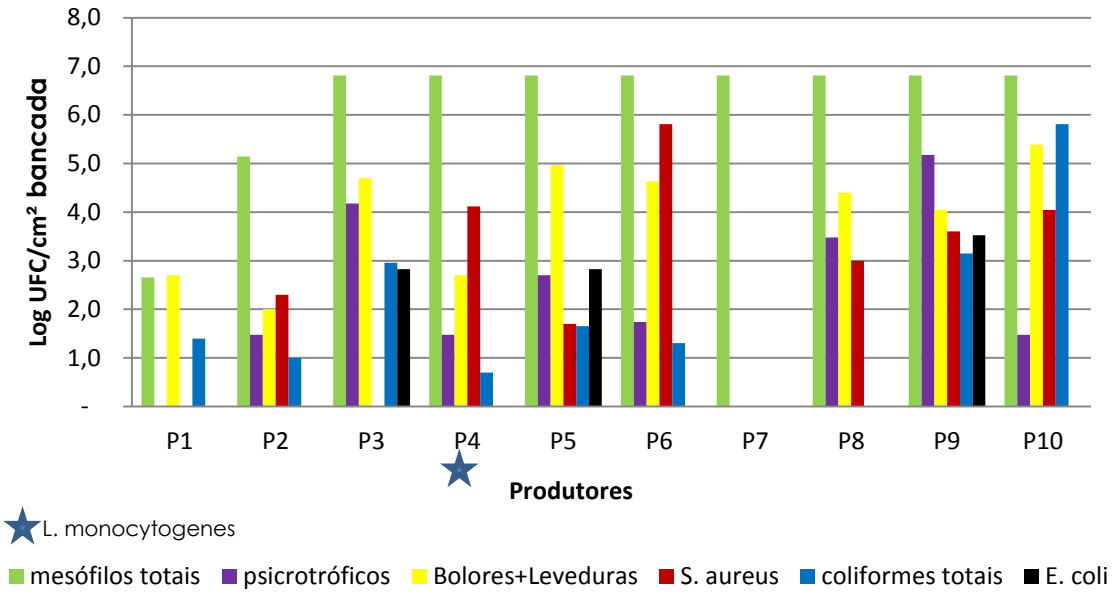


Figura 8. Contagens de microrganismos nas bancadas de manipulação de alface

A presença de *E. coli* ocorreu nas bancadas dos produtores 3 e 5, onde encontrou-se a população de $6{,}6.10^2$ UFC/cm^2 e a bancada do produtor 9 apresentou $3{,}3.10^3$UFC/cm^2 para o mesmo microrganismo.

Somente para a bancada do produtor 4 encontrou-se resultado positivo para a *L. monocytogenes*.

4.3 Quantificação de microrganismos nas caixas de colheita

Na **Figura 9** pode-se verificar população pronunciada de mesófilos totais para as caixas plásticas de colheita. Os produtores 1, 2 e 5 apresentaram menor população que os demais produtores.

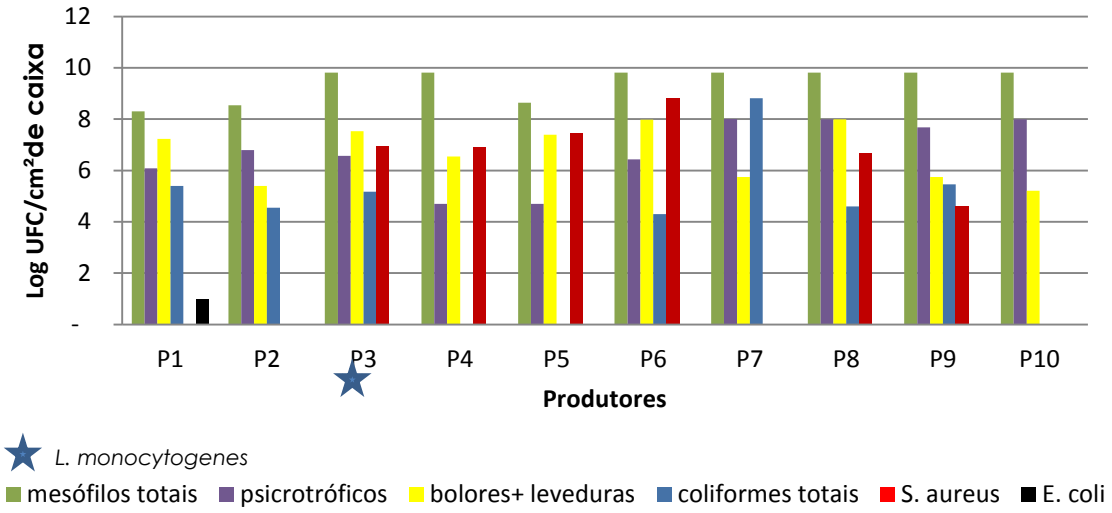


Figura 9. Contagem de microrganismos em caixas de colheita de alface.

A coleta do produtor 6 apresentou *E. coli* (10^4 UFC/cm^2) e nas caixas do produtor 3 foi detectada a presença de *L. monocytogenes*.

Pode-se inferir que o modo de limpeza das bancadas e caixas dos produtores 1, 2 e 5 são mais eficientes e que os produtores 6 e 3 possuem possível fonte de contaminação para patogênicos.

A caixa do produtor 7 apresentou alta população de coliformes totais, mas não apresentou *E. coli*.

4.4 Quantificação de microrganismos na faca de colheita

A **Figura 10** apresenta dos resultados de contagens para as facas, que apresentaram maiores populações de mesófilos totais que os demais microrganismos.

As facas dos produtores 1 e 2 apresentaram menor população de mesófilos que os demais produtores. A faca do produtor 3 apresentou a presença de *L. monocytogenes* e nenhuma faca apresentou *E. coli*.

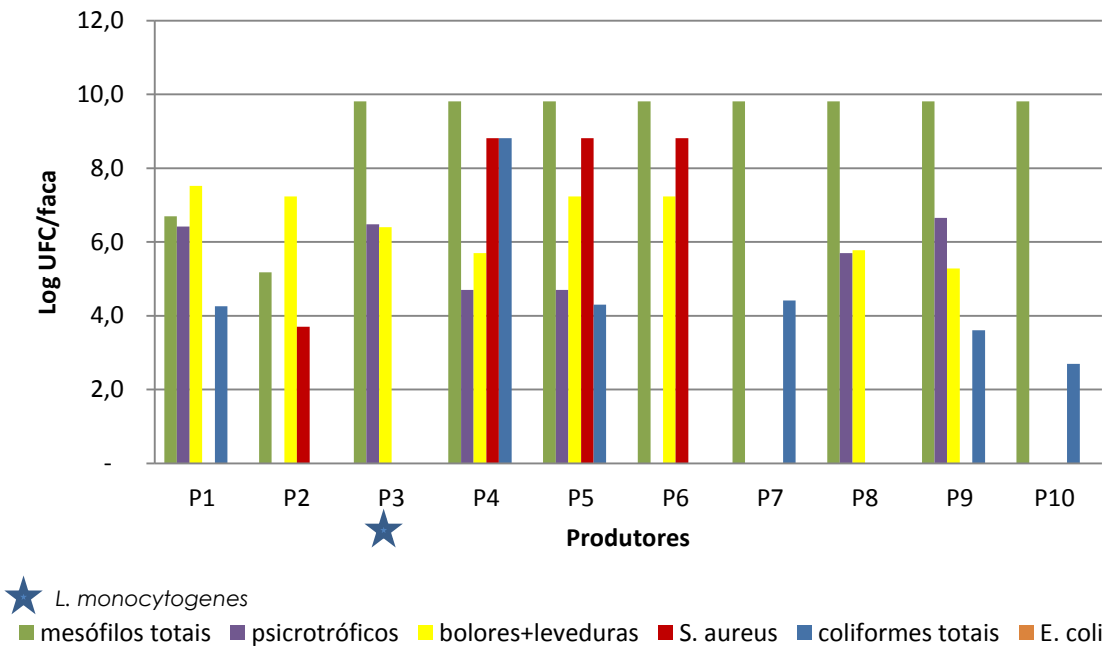


Figura 10. Contagem de microrganismos em utensílio (faca) de colheita.

4.5 Quantificação de microrganismos nas mãos dos manipuladores

Na **Figura 11** estão apresentadas as contagens de microrganismos nas mãos dos agricultores. Verifica-se que a amostragem com a esponja conseguiu recuperar um maior número de microrganismos quando comparado ao swab. As populações de mesófilos totais foram maiores que $6{,}5.10^9$ UFC/mão para 11 amostragens, as contagens menores foram para os produtores 1 e 2.

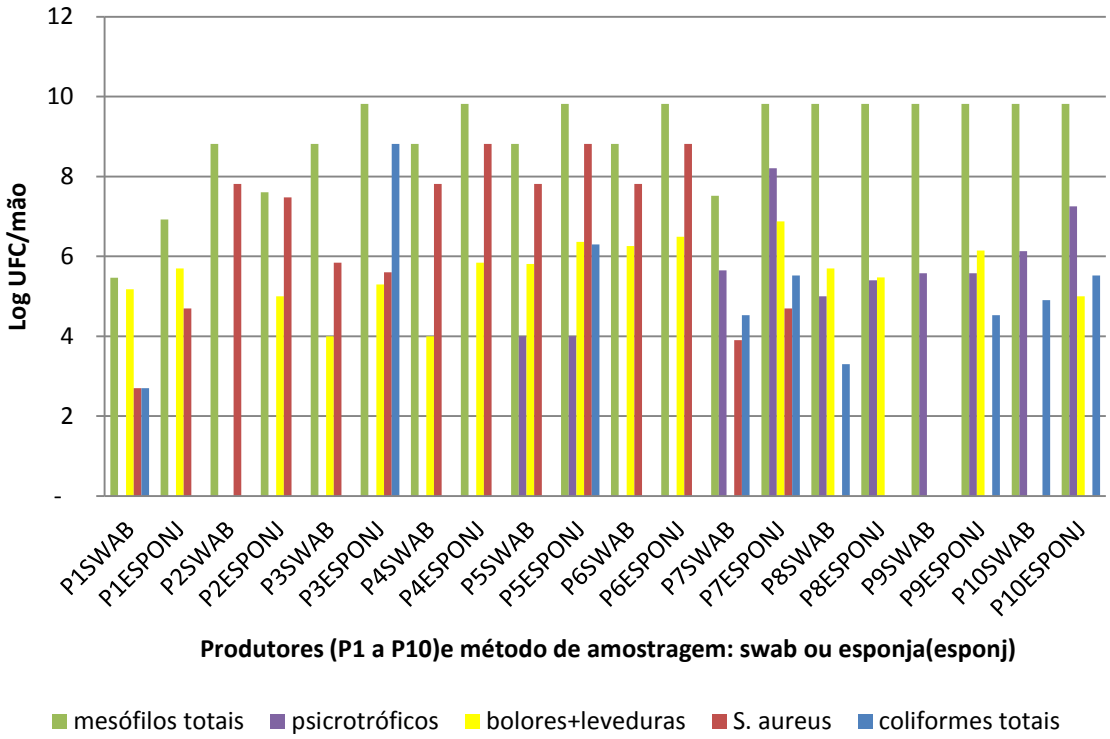


Figura 11. Gráfico de distribuição de microrganismos em mãos, utilizando swab ou esponja (esponj).

4.6 Resultados das imagens de superfícies de alfaces

A **Figura 12** e **Figura 13** apresentam o aspecto dos espécimes prontos para imagem em MEV.

Figura 12. Espécime: alface não esponjeada após fixação para imagem.

Figura 13. Espécime: alface esponjeada após fixação para imagem.

As imagens da alface esponjeada (B) apresentaram a superfície com aspecto limpo, sem presença de microrganismos e outros contaminantes, conforme imagem na **Figura 14**, em comparação com a superfície da alface sem esponjeamento (A).

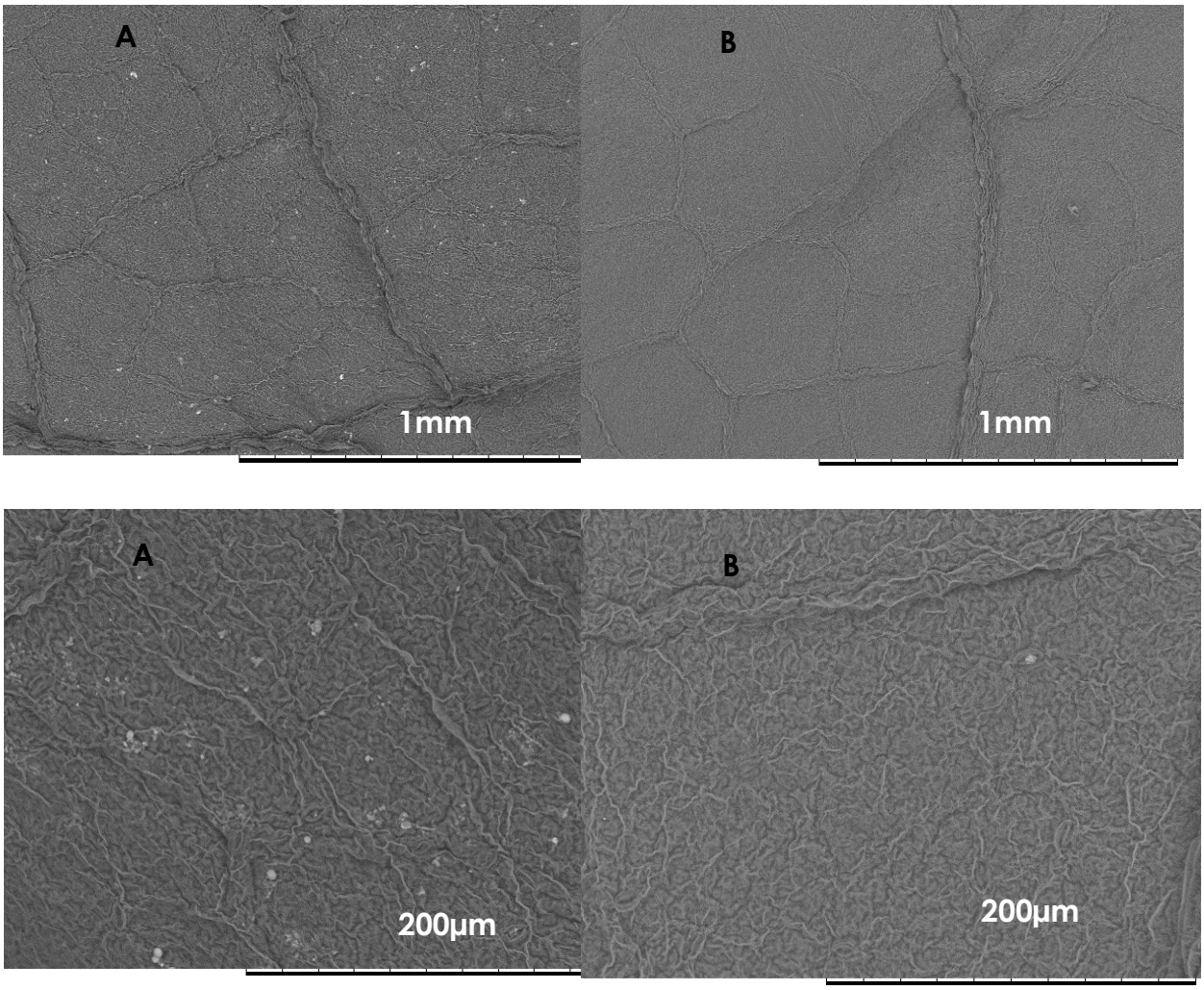


Figura 14. Imagem de alface não esponjeada (A) e alface esponjeada (B)

As imagens da **Figura 15** e **Figura 16** permitem visualizar a microbiota natural sobre a folha de alface e seu desenvolvimento no interior dos estômatos, bem como estômatos livres de contaminações.

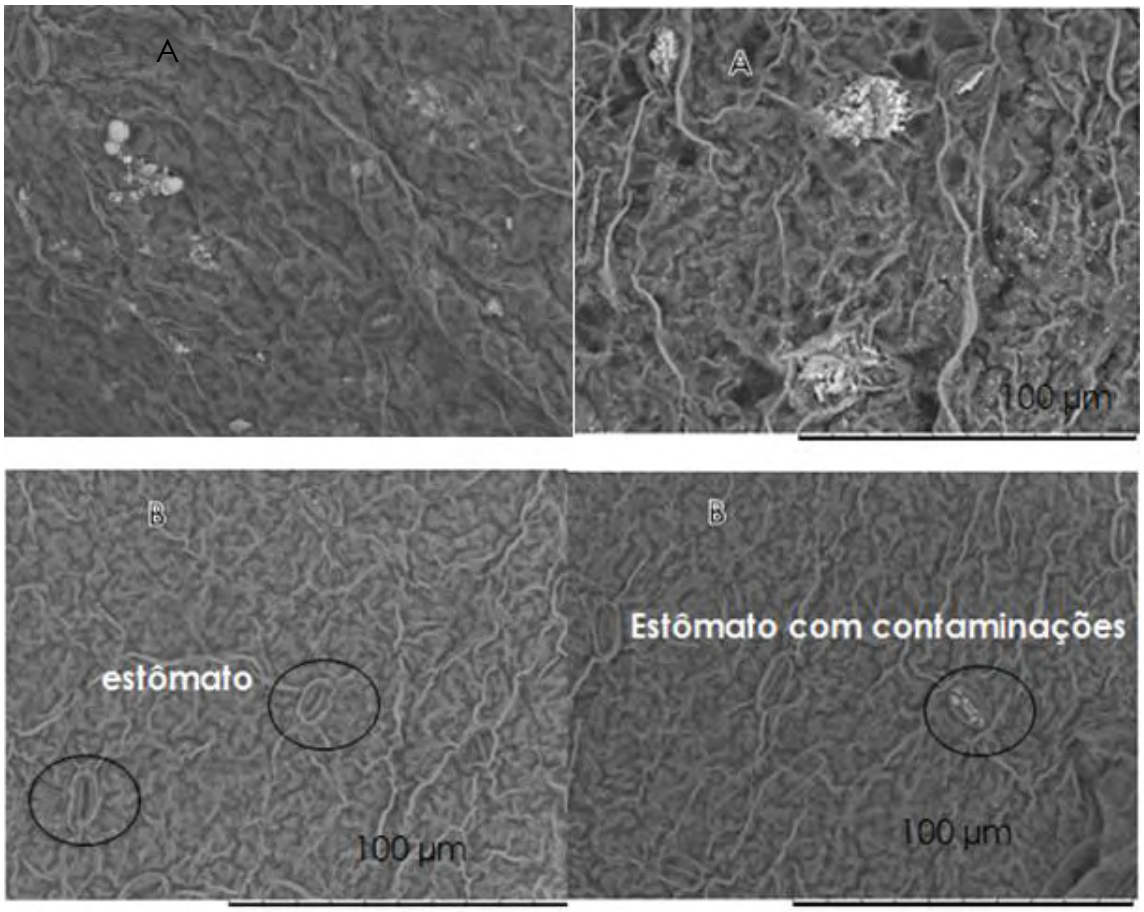


Figura 15. Estômatos e superfícies de alface não esponjeada (A) e alface esponjeada (B)

As imagens confirmaram que microrganismos podem se concentrar em estômatos e fendas naturais de folhas de alface e que estas áreas podem ser de difícil sanitização, como relatado nos trabalhos de Koseki *et al.*(2001); Shaw *et al.* (2008) e Gomes *et al.* (2009)

Também confirmam que a esponja foi um bom instrumento para recuperação de microrganismo na superfície de folha de alface. Conforme Lewandowski (2010) esfregar com uma esponja de espuma foi mais eficiente que swab de poliéster na recuperação de esporos em superfícies contaminadas e a esponja é confiável na amostragem de superfícies. Clemons (2010) relatou que esponjas são usadas de forma semelhante ao swab, sendo vantajosas para a amostragem de grandes superfícies.

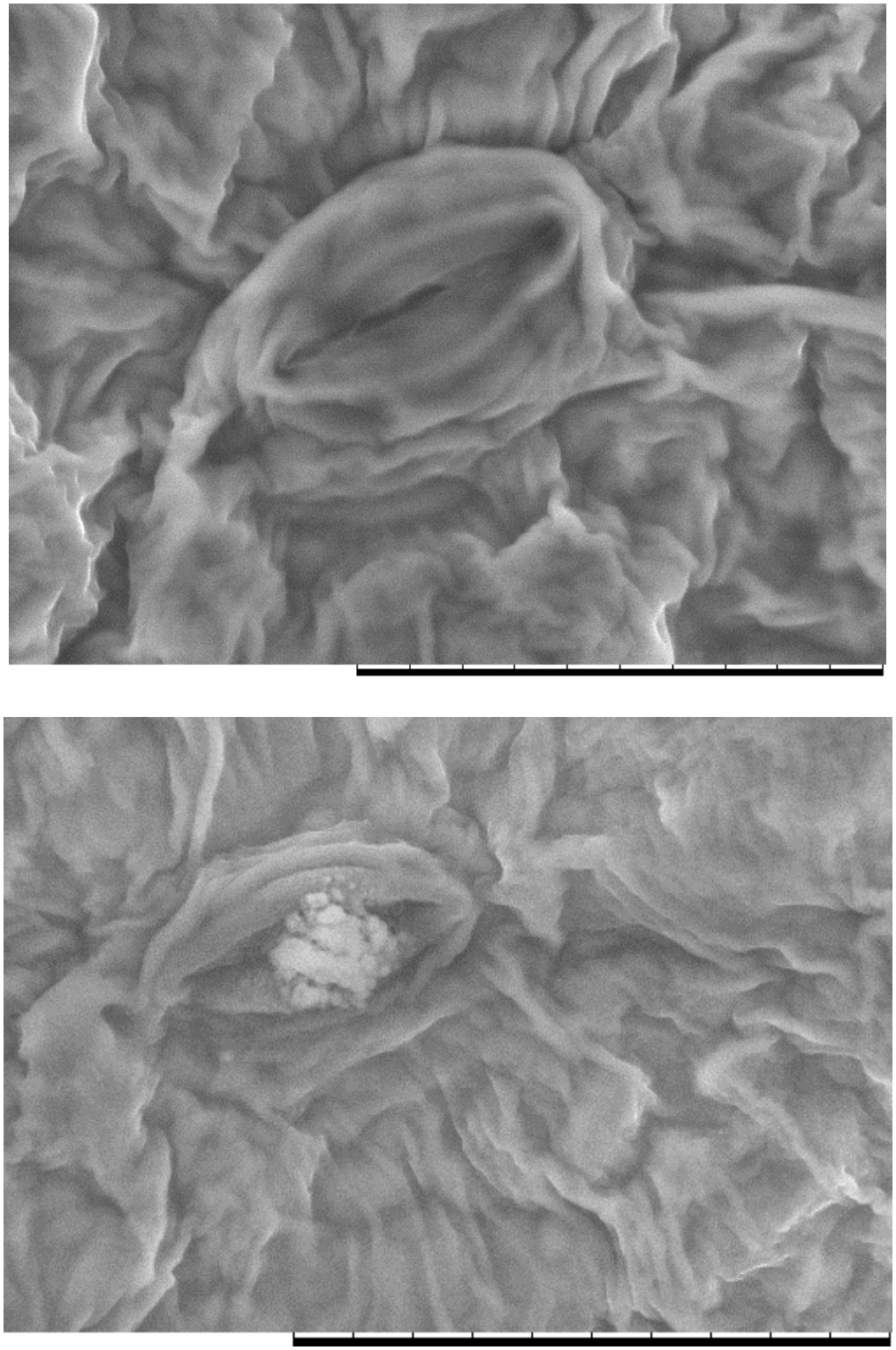


Figura 16. Estômatos em superfície de alface sem contaminações e com presença da microbiota natural.

5. Conclusões

A presença de patógeno humano ou sua ausência não se relacionou com as contagens de microrganismos indicadores.

O método de esponjeamento de superfícies pode recuperar patógenos de vegetais antes da colheita e das superfícies que entram em contato com esta produção, podendo portanto localizar sua ocorrência.

No caso de superfícies de alface, a imagem em microscopia eletrônica demonstra uma boa recuperação e revelam que existem microrganismos internalizados nas cavidades de estômatos, podendo ser de difícil acesso para processos de descontaminação. Assim, a manutenção das folhas intactas, desde a produção até o processamento é medida importante para evitar internalização e crescimento de patógenos.

A localização de patógenos é uma informação importante para tomar medidas preventivas e corretivas e o esponjeamento pode ser ferramenta para ampliar a localização, especialmente de patógenos com distribuição errática, além disso o envio de esponjas ao laboratório é mais prático que o envio de amostras vegetais, que ocupam volume maior para transporte.

O uso de técnicas de detecção rápidas de patógenos podem promover a agilidade na implementação de medidas corretivas, pois em 24 horas pode-se verificar a presença de patógenos, podendo ser realizada mesmo antes da colheita do produto.

Maiores estudos podem ser realizados para explorar a potencialidade de diversos materiais possíveis de utilização na amostragem e protocolos de amostragem podem facilitar a tomada de decisão em ações corretivas, baseadas em resultados de localização de patógenos.

6. Referências Bibliográficas

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international.** 18ª ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists – AOAC, 2007.

BAILEY, J. S. Detection of Salmonella cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX System. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p. 792-795, July. 1998.

BAX ® System. **BAX®System Manual do Usuário.** Madasa, versão 1.96. 104 p. 2014. <http://www.verusmadasa.com.br/produtos_pdf/manualbaxsystem_v196_portugues.pdf > Acesso em: 08/01/2014

BERGER, C. N. et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology,** West Sussex, v. 12, n. 9, p. 2385-2397, 2010.

BRANDL, M. T. Plant lesions promote the rapid multiplication of Escherichia coli O157:H7 on postharvest lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 17, p. 5285-5289, 2008. doi:10.1128/AEM.01073-08.

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.

BRASIL. **Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2013. 37 p.

CLEMONS, J. A. **Novel approaches for the efficient sampling and detection of listeria monocytogenes and brochothrix thermosphacta on food contact surfaces**. Tennessee: University of Tennessee, 2010. Disponível em: <http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/784>. Acesso em: 05 mar. 2012.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção 2.** 2. ed. Seropédica, RJ: Embrapa, 2006.

GOMES, C. et al. Understanding E . coli internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 135, n. 3, p. 238–247, 2009. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.026.

KOSEKI, S.; YOSHIDA, K.; ISOBE, S.; ITOH, K. Decontamination of Lettuce Using Acidic Electrolyzed Water. **Journal of Food Protection,** Des Moines, v. 64, n. 5, p. 652–658, 2001.

KUSHIDA, M. M. **Validação de métodos laboratoriais:** avaliação do sistema BAX de análise de *Salmonella sp* em alimentos por reação de Polimerase em cadeia (PCR). 2005. 194 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S. C. e STRUIJK, C. B. Advances In The Bacteriology Of The Coliform Group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. **Annual Review Microbiology,** Palo Alto, v. 55, p. 201–234, 2001.

LEWANDOWSKI, R. et al. Use of a foam spatula for sampling surfaces after bioaerosol deposition. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 76, n. 3, p. 688–94, 2010. doi:10.1128/AEM.01849-09

LÓPEZ-GÁLVEZ, F. et al. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. **Food Microbiology,** London, v. 27, p. 199-204, 2010.

OLAIMAT, A. N.; HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. **Food Microbiology**, London, v. 32, p. 1-19, 2012.

RASTOGI, G. et al. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. **The ISME Journal**, London, v. *6, n.* 10, p. 1812–22, 2012. doi:10.1038/ismej.2012.32.

REIS, V. M. **Interação entre plantas e mircrorganismos**. Seropedica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 24 p. (Documentos, 194).

SCHARFF, R. Health-related costs from foodborne ilness in the United State**. Produce Safety Project**. Washington, 2010. 28 p. Disponível em: <http://www.pewhealth.org/uploadedFiles/PHG/Content_Level_Pages/Reports/PSP-Scharff%20v9.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2013.

SHAW, R. K. et al. Enterohemorrhagic Escherichia coli exploits espa filaments for attachment to salad leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. *74, n.* 9, p. 2908–2914, 2008. doi:10.1128/AEM.02704-07.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

TEPLITSKI, M. et al. Functional genomics studies shed light on the nutrition and gene expression of non-typhoidal Salmonella and enterovirulent E. coli in produce. **Food Research International**, Kidlington, v. 45, n. 2, p. 576–586, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.020.

TOMPKIN, R. B. Control of Listeria monocytogenes in the food-processing environment. **Journal of food protection**, *65*(4), 709–25. 2002.

WHO. ***Codex alimentarius.*** <http://www.codexalimentairus.org> Acesso em: 16/01/2014

ZERDAS, E. R. M. A. **Avaliação do uso de surfactantes na remoção de *Salmonella enteritidis* aderida em superfície foliar de alface**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CAPÍTULO III

Estabilidade microbiológica e sensorial de alface orgânica minimamente processada, lavada com água da rede e sanitizada, durante o armazenamento refrigerado.

RESUMO

RIZZO, D. L. **Estabilidade microbiológica e sensorial de alface orgânica minimamente processada, lavada com água da rede e sanitizada, durante o armazenamento refrigerado.** Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O processamento mínimo de alface orgânica depende de processos de sanitização para diminuir a carga microbiológica, mas a higienização pode promover injúrias e diminuir a qualidade sensorial. Durante o armazenamento refrigerado a população de microrganismos pode se desenvolver novamente. Alguns trabalhos consideram que o uso de sanitizantes e o uso apenas da lavagem com água da rede podem ter efeitos semelhantes na descontaminação. Foi objetivo o estudo da microbiota de superfície da folha de alface e da qualidade sensorial do produto, durante o armazenamento refrigerado (8ºC), após o tratamento apenas com água da rede, comparado com o uso de santizantes. Os tratamentos foram: 1 – Lavagem com água da rede e sanitização com dicloroisocianurato de sódio dihidratado; 2 – Lavagem com água da rede e sanitização com oxicloreto de cálcio; 3 – Lavagem em água da rede, sem sanitização; e 4 - Sem lavar e sem sanitizar. Avaliações microbiológicas foram realizadas aos 1, 3 e 8 dias, após colheita, sendo a amostragem realizada com o uso de esponja estéril imersa em água peptonada tamponada. Foram pesquisados os microrganismos da superfície das folhas: mesófilos totais e psicrotróficos, Bolores+Leveduras, *Escherichia coli* e coliformes totais, *Staphylococcus aureus e Salmonella sp*. Métodos da AOAC foram utilizados, sendo BAX System para a detecção de *Salmonella sp.* Foram realizadas avaliações sensoriais com 100 consumidores aos 2, 4 e 9 dias após a colheita. Foi utilizada escala híbrida com valores de 0 (certamente não me agradou) e 10 (certamente me agradou). Após lavagem com água da rede e tratamento com sanitizantes, as populações de microrganismos

diminuíram, mas aos 7 dias após armazenamento refrigerado, as populações aumentaram chegando a superar os valores iniciais, exceto para *S. aureus*. Na avaliação sensorial, 25,6% dos respondentes consomem alface mais que duas vezes por semana e o tratamento 4 - Sem Lavar e sem sanitizar foi significativamente menos aceito ($p<0,05$) para os atributos odor, frescor, integridade da folha, aspecto geral e intenção de compra que os demais tratamentos que não diferiram entre si.

Palavras chave: aceitação sensorial, qualidade microbiológica, sanitização.

ABSTRACT

RIZZO, D. L. **Microbiological and sensory stability of organic minimally processed lettuce, treated with tap water and sanitized, during refrigerated storage**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Minimal processing of organic lettuce depends on sanitization processes to reduce microbiological load during refrigerated storage. Sanitization can promote injuries and also decrease the sensory quality. A study was conducted to verify the microbiota on lettuce leaf surface and to determine its sensory quality in four treatments, while under refrigerated storage (8°C). The treatments were: 1 – washed in tap water and sanitized with sodium dichloroisocyanurate dihydrate; 2 – Washed in tap water and sanitized with calcium oxychloride; 3 - Washed in tap water, without sanitizing; and 4 – Without washing or sanitizing. Microbiological evaluations were conducted at 0, 2 and 8 days, after treatments, with the use of a sterile sponge immersed in peptone water to recover the microorganisms on leaves: mesophilic, psychrotrophic, yeasts and molds, total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella sp*. AOAC methods were used for counting microorganisms, and for *Salmonella sp.* the BAX System was used to determine presence or absence. Sensory evaluations were performed with untrained panels at 2, 4 and 9 days after harvest, 100 participants utilized a hybrid scale with values from 0 (certainly did not please me) to 10 (certainly pleased me). After treatment with sanitizers and washing with tap water, populations of microorganisms decreased compared with unwashed leaves, but at 7 days after sanitization, in cold storage, populations increased above the initial values, except for *S. aureus*. In sensory evaluations 25.6% of respondents consume lettuce more than twice a week. Only the treatment 4 - without washing or sanitizing was significantly lower ($p<0.05$) in the assessments for odor, freshness, leaf

integrity, general appearance and purchase intent. The other treatments did not differ among them.

Keywords : acceptability, microbiological quality, sanitization.

1. Introdução

Surtos relacionados a produtos frescos são cada vez mais frequentes. Um terço dos surtos com alimentos são associados a folhosas contaminadas com norovirus ou com *E. coli* enterohemorrágica (IOM, 2012).

A produção orgânica é associada aos insumos de origem biológica, este fato é positivo sob o aspecto de sustentabilidade e saúde, pois não se usa agrotóxicos, porém o uso de insumos biológicos é associado a contaminações alimentares por patógenos humanos (DAROLT, 2003).

Tal afirmação se torna controversa, pois o equilíbrio e a maior variabilidade ambiental proporcionada pelo sistema orgânico pode ser fator de controle de patógenos humanos, e muitos microrganismos presentes no meio ambiente podem favorecer a saúde humana. Estudos recentes estimam que existem 3 a 4 kg de microrganismos associados ao nosso organismo, o que se conhece hoje com o nome de metagenoma (QIN *et al.* 2010).

O processamento mínimo de vegetais é crescente (MORETTI, 2007) devido às mudanças dos hábitos de consumo e a higienização de vegetais se torna necessária, porém em estudos que verificam a eficiência do processo de sanitização logo após a aplicação, um dos aspectos mais discutidos é a eficiência da operação (Gil *et al.*, 2009).

A higienização de vegetais promove injúrias que favorecem a internalização de patógenos, como também diminuem sua qualidade sensorial. O armazenamento refrigerado pode favorecer microrganismos psicrotróficos, ou seja, microrganismos que proliferam em temperatura ambiente, mas também sob refrigeração, alguns deles patógenos importantes como *Listeria monocytogenes* (TOMPKIN, 2002).

É bem conhecido que hortaliças frescas geralmente dependem de limpeza com água e produtos sanitizantes para reduzir a carga

microbiana e para manter a qualidade e prolongar a vida de prateleira do produto final. A água é uma ferramenta útil para reduzir a contaminação potencial, mas também pode transferir os microrganismos patogênicos. A lavagem em água é importante, em particular para a remoção do solo e detritos (Gil *et al.,* 2009).

A redução microbiana com uso de sanitizantes apresenta resultados melhores quando comparado com a lavagem com água, mas depois do armazenamento, microrganismos epífitas crescem rapidamente, atingindo níveis semelhantes a aqueles anteriores a sanitização. Na verdade, apesar da idéia geral de que sanitizantes são usados para reduzir a população microbiana do produto, o seu efeito principal é a manutenção da qualidade microbiológica da água. A utilização de água potável, em vez de água contendo agentes de desinfecção química para lavar vegetais frescos está sendo defendida em alguns países europeus (Gil *et al.,* 2009).

Além dos aspectos técnicos discutidos sobre sanitização, a produção orgânica possui legislação própria para o uso de sanitizantes no pós-colheita, definidos pela Instrução Normativa Conjunta Nº 18, de 28 de maio de 2009 (BRASIL, 2009) e sua atualização, Instrução Normativa nº 24, de 01 de junho de 2011, sobre aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia permitidos no processamento de produtos de origem vegetal e animal orgânicos (BRASIL, 2011).

O presente estudo pretendeu avaliar a qualidade microbiológica e sensorial de alface orgânica processada minimamente, lavada em água da rede, com ou sem o uso de sanitizantes, durante o armazenamento refrigerado.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Quantificar a microbiota na superfície de folha de alface orgânica processada minimamente e sua qualidade sensorial durante armazenamento refrigerado a 8ºC, após lavagem com água da rede e uso de sanitizantes.

3. Material e Métodos

3.1 Matéria-prima e amostragem

A alface (*Lactuca sativa)* in natura foi coletada de produtor pertencente à APO – Associação dos Produtores Orgânicos de Ribeirão Claro - PR. O grupo é composto de pequenos agricultores familiares que se dedicam a olericultura desde 2009, quando se iniciou o "Projeto Vida na Horta", que se utiliza da metodologia PAIS – Produção Agroecológica Integrada e Sustentável, tecnologia social desenvolvida pelo SEBRAE e Fundação Banco do Brasil, certificados pela TECPAR-Instituto de Tecnologia do Paraná. É uma empresa pública com sede em Curitiba-PR, com acreditação pelo INMETRO, como organismo para certificação de sistemas da qualidade e de produtos.

A amostragem foi realizada no campo, colhendo-se, ao acaso, cerca de 24 kg de alface variedade crespa, 40 pés, dependendo das variações de crescimento, à época da amostragem.

As plantas foram colhidas na manhã, colocadas em saquinhos plásticos individuais e levadas para refrigerador com temperatura de 10ºC. Ao final da tarde, foram colocadas em caixa de isopor, em pé, com gelo na parte do fundo da caixa e transportadas para o Laboratório de bioprocessos da FZEA/USP em Pirassununga chegando às 9 horas, cerca de 24 horas após colheita.

3.2 Produção da alface minimamente processada

A **Figura 17** representa o fluxograma das etapas de processamento de alface minimamente processada.

O corte do talo e o desfolhamento foram realizados manualmente, realizando primeira seleção para descartar as folhas externas e as internas que apresentaram qualquer tipo de dano.

Na segunda seleção foram retiradas as folhas com danos que não foram detectadas na seleção anterior.

As folhas foram divididas em quantidades semelhantes para os quatro tratamentos propostos. Um grupo de folhas não foi submetido à lavagem (SL), um dos grupos foi somente lavado em água da rede (L) e dois grupos foram lavados e submetidos aos tratamentos de imersão em água contendo os tratamentos com os sanitizantes, que foram os sanitizantes oxicloreto de cálcio (OC) e dicloroisocianurato de sódio dihidratado (DI).

Após a sanitização, foi realizado o enxágue por imersão do produto em água da rede. O excesso de água foi retirado em centrífuga manual.

O acondicionamento foi realizado em sacos de polietileno contendo quatro folhas, sendo 2 folhas externas, uma folha mediana e 1 folha nova, perfazendo cerca de 55g de produto. O armazenamento das amostras foi efetuado a temperatura de 8°C, por 9 dias após colheita.

Recebimento da matéria prima

↓

1º Seleção: corte do talo e desfolhamento

↓

1ª Lavagem em água corrente da rede

↓

2ª Seleção

↓

Tratamento sanitizante

↓

Centrifugação

↓

Embalagem (55 g)

↓

Armazenamento a 8ºC

Figura 17. Fluxograma de processamento de alface minimamente processada.

3.3 Tratamentos

Foram avaliados quatro tratamentos: 1 – Lavagem (em água da rede) e sanitizada com dicloroisocianurato de sódio (DI); 2 – Lavagem (em água da rede) e sanitizada com oxicloreto de cálcio (OC); 3 – Lavada apenas com água da rede, sem sanitização (L), e 4 - Alface sem lavar e sem sanitização (SL). Foram armazenados 44 embalagens de cada tratamento, contendo 4 folhas conforme descrito no **item 3.1.** O tempo de tratamento com o sanitizantes foi de 10 minutos e as dosagens foram: 6,6 gramas de dicloroisocianurato de sódio

dihidratado (6,25% p.a.)/litro de água e 0,05 gramas de oxicloreto de cálcio(58% p.a.)/litro de água, conforme especificação do fabricante.

3.4 Análises microbiológicas

De cada tratamento foi escolhida uma embalagem ao acaso, para análise microbiológica dos seguintes microrganismos: mesófilos totais, psicrotróficos, bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Salmonella* sp.; em 3 períodos após a colheita, após tratamentos, em armazenamento refrigerado (8ºC): no 1º dia (logo após a sanitização), aos 3 dias e aos 8 dias. Para a amostragem microbiológica foi utilizada esponja de celulose estéril imersa em 10 mL de Água Peptonada Tamponada (APT), esfregada na face superior de três folhas (peso médio de 34 gramas) escolhidas ao acaso dentro de uma embalagem. Foram realizadas 2 repetições para cada tratamento.

Após esponjeamento da superfície das folhas, as esponjas foram colocadas em sacos de amostragem estéreis nos quais foram adicionados 90 mL de água peptonada tamponada (APT) e a seguir homogeneizadas em *Stomacher*, marca Marconi, modelo MA 440/CF, por 90 segundos. A partir desta diluição, considerada 10^{-2}, foram transferidas alíquotas de 1 mL e realizadas diluições decimais seriadas em 9 mL de APT, até 10^{-4}, nas quais foi analisada a presença dos microrganismos alvos.

As análises microbiológicas foram realizadas conforme descrito no **3.2 do capítulo II.**

3.5 Análises sensoriais

Nos dias 2, 4 e 9 após colheita foi realizada análise sensorial para verificar se os sanitizantes afetaram a qualidade e aceitabilidade da alface. Para tanto o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética e aprovado, recebendo o número CAAE: 13376313.7.0000.5422.

Para as análises sensoriais foram abertas as embalagens e escolhidas folhas ao acaso, colocadas sobre bandeja, sem a embalagem. A mesma bandeja com as folhas foi utilizada em várias avaliações, sendo trocada cada vez em que se verificava murchamento.

A aceitabilidade e vida útil da alface submetida aos diferentes tratamentos foram avaliadas por Teste de Aceitação utilizando-se 100 consumidores de alface (MEILGAARD *et al*., 1987) que avaliaram a aparência e odor dos produtos. As avaliações foram realizadas para as seguintes características: odor, integridade da folha, aspecto geral, frescor e intenção de compra. A escala utilizada para avaliação foi a escala híbrida, com níveis de 0 (certamente não me agradou) até 10 (certamente me agradou), a ficha se encontra na **Figura 18.** Também foi solicitado a frequência de consumo.

Foi realizada avaliação estatística dos resultados, com análise de variância ANOVA e teste de médias Duncan a um nível de significância de $p<0,05$.

FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DE ALFACE ORGÂNICA

Nome:_____ Data: _____
Idade:_____email:_____

Você recebeu 1 amostra de alface orgânica. Por favor, anote o código da amostra e avalie a amostra e utilizando as escalas para responder às questões:
Código:_____

Aspecto a avaliar: odor **Avaliação:** 0__•__•__•__•__5__•__•__•__•__10 Certamente não me agradou certamente me agradou
Aspecto a avaliar: integridade da folha **Avaliação:** 0__•__•__•__•__5__•__•__•__•__10 Certamente não me agradou certamente me agradou
Aspecto a avaliar: frescor **Avaliação:** 0__•__•__•__•__5__•__•__•__•__10 Certamente não me agradou certamente me agradou
Aspecto a avaliar: aspecto geral **Avaliação:** 0__•__•__•__•__5__•__•__•__•__10 Certamente não me agradou certamente me agradou
Aspecto a avaliar: intenção de compra **Avaliação:** 0__•__•__•__•__5__•__•__•__•__10 Certamente não me agradou certamente me agradou

Figura 18. Ficha para avalição sensorial de alfaces

4. Resultados e discussão

4.1 Resultados das análises microbiológicas

A **Figura 19** demonstra a variação dos microrganismos durante o armazenamento refrigerado (8ºC) para os tratamentos descritos no **item 3.3**.

Inicialmente, a população de mesófilos totais estava abaixo de 10^7 para todos os tratamentos. Na última avaliação, a contagem foi superior a 10^7 para todos os tratamentos.

No estudo prévio de rastreamento de alface no campo, descrito no capítulo II, onde foram esponjeadas alface antes da colheita, a maior população determinada foi a de mesófilos totais (>2.10^8 UFC/folha média). Em revisão de Vorholt (2012) sobre a filosfera, o autor cita que a população de bactérias está em torno de 10^6 a 10^7 por centímetro quadrado de superfície foliar.

Assim podemos verificar que no final do armazenamento refrigerado, a quantificação de mesófilos totais está próxima à população normal encontrada na filosfera.

Os resultados de Santos *et al.* (2010) mostraram contagens de microrganismos em log UFC/g, semelhantes aos obtidos, sendo aeróbios mesófilos entre 3,09 e 8,94, de bolores e leveduras entre 3,19 e 6,61 e coliformes totais entre <1 e 7,73, e não foi detectada a presença de *Salmonella sp.,* num total 180 amostras analisadas

Gil *et al.*(2009) relata que a sanitização pode reduzir a população de bactérias de 2 a 3 log, mas ao final do armazenamento as populações se igualam ao tratamento lavagem com água da rede.

Domenéch *et al*. (2013) encontraram populações de *L. monocytogenes* maiores que 100 UFC/g, em apenas 0,1% das amostras de alface. O autor concluiu que qualquer tipo de lavagem para esse nível de contaminação é suficiente para a recomendação da iniciativa US Healthy People 2020 (USHP, 2011), porém quando a contaminação é de 3 log UFC/g, lavar sob água da rede não é suficiente, necessitando de sanitizantes. Entretanto quando a contaminação é alta, 6 ou 9 log UFC/g, nenhum tratamento estudado é efetivo.

Lavar sob água da rede permite um máximo de redução da carga inicial de 1 log UFC/g, alcançando este valor em aproximadamente 30 s, mas no uso doméstico o tempo utilizado normalmente é de 10 s, e a redução atingida foi de 0,6 log UFC/g (DOMENÉCH *et al.*, 2013).

Davidson, Buchholz e Ryser (2013) utilizaram sanitizantes em alface, e observaram que nenhum tratamento foi significativamente mais efetivo do que o uso apenas da água para *E. coli.* As reduções variaram de 0,75 a 1,4 log CFU/g.

Os resultados para psicrotróficos demonstram quantificações próximas de 10^7 para os tratamentos "lavados" e "sem lavar". Nos tratamentos utilizando sanitizantes as contagens diminuiram 2 log, ficando próximas de 10^5, logo após a sanitização. As contagens atingiram 10^9 ao final das avaliações, para todos os tratamentos, acima da quantificação inicial, mesmo das alfaces que foram armazenadas como vieram do campo, representada pelo tratamento "sem lavar". Segundo Venneria *et al.* (2012), após sanitização com cloro a 2%, por 1 minuto, houve redução inicial de 2 log para a população de mesófilos e fungos para 175 amostras de folhosas minimamente processadas. No mesmo trabalho houve aumento de mesófilos em endívia e alface, após uma semana de estocagem, à 4°C, chegando a valor acima de 10^7 CFU/g.

Soendjojo et al. (2012) verificaram a tendência de um maior número de psicrotróficos em vegetais folhosos com armazenamento e distribuição refrigerada.

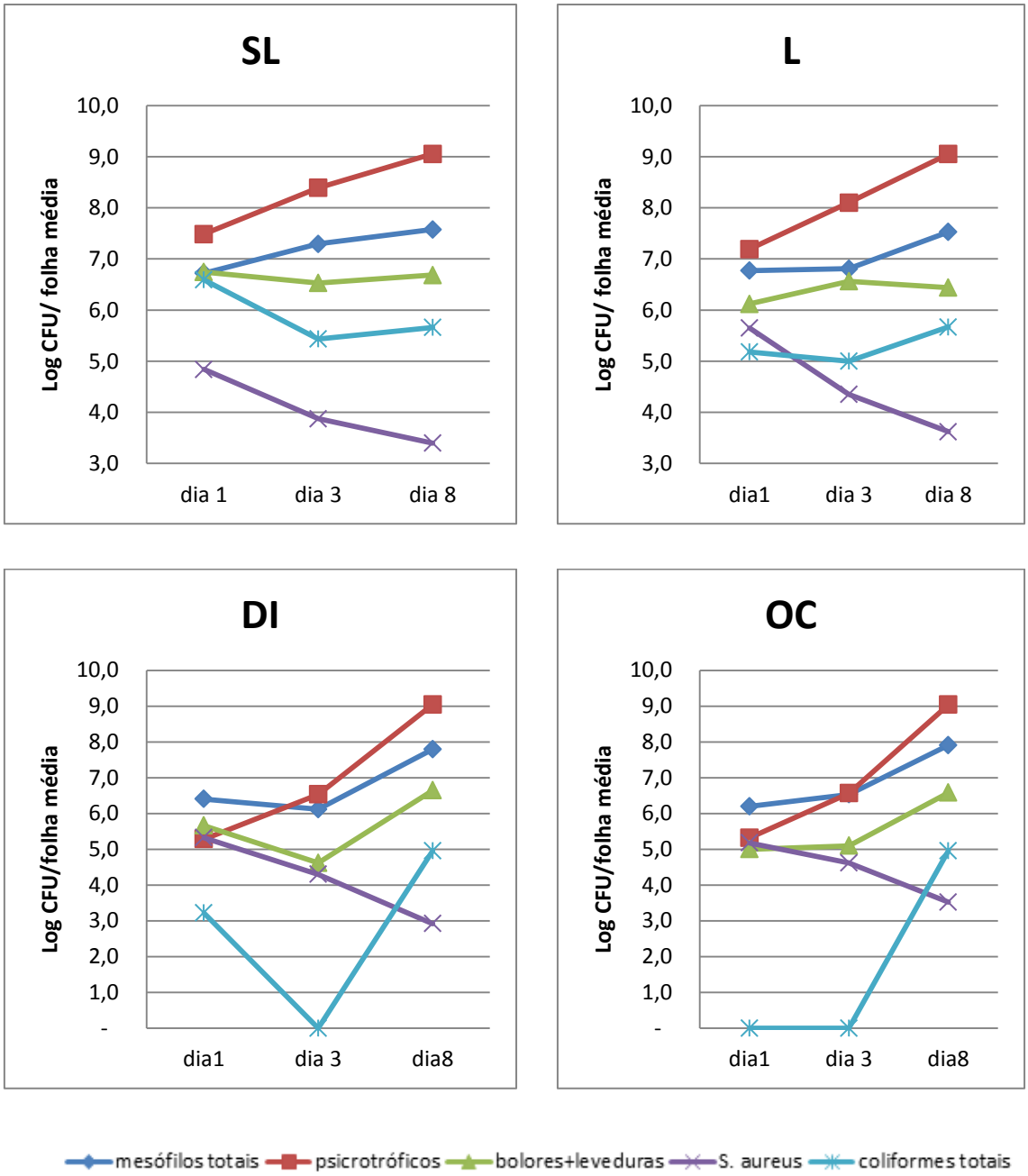


Figura 19. Quantificação de microrganismo durante armazenamento refrigerado (8ºC), para os tratamentos: SL (sem lavar, sem sanitizar); L(apenas lavada em água da rede); DI (lavada e sanitizada com dicloisocianurato de sódio); OC (lavada e sanitizada com oxicloreto de cálcio)

A contagem realizada para as populações de *S. aureus*, Bolores+Leveduras e coliformes totais, foram semelhantes, logo após a sanitização ou apenas com a lavagem em água da rede. Verificou-se que o armazenamento refrigerado foi a causa de diminuição da

população de *S. aureus*, que estava na ordem de10^4 e 10^5 no início, caindo para 10^2 e 10^3 na avaliação final.

O estudo descrito **no item 4 do capítulo II**, sobre as populações de coliformes totais, bolores e leveduras e *S. aureus* em superfície de alface no campo, realizado previamente às análises de sanitização, demonstrou que a população destes microrganismos foi muito heterogênea, em 20 avaliações, apenas duas coletas apresentaram *E. coli*. As alfaces utilizadas neste estudo foram provenientes de uma plantação onde não foi detectada presença de *E. coli* no estudo de campo, assim como também ocorreu neste estudo sobre sanitização.

E. coli pode se internalizar e sobreviver nas plantas. Soendjojo *et al*. (2012) verificaram coliformes internalizados tanto em alface, como no espinafre, indicando que estas bactérias são capazes de internalizar e sobreviver dentro do tecido da planta, mesmo que tenham sido aplicadas medidas de higienização pós-colheita.

Os resultados do Bax System não indicaram presença de *Salmonella sp.*, no dia 0 e dia 7 da armazenagem após sanitização.

O uso de sanitizantes reduziu em cerca de 2 log a população de mesófilos totais e psicrotróficos, logo após o processo de sanitização, mas durante o armazenamento refrigerado, ocorreu o crescimento das populações a níveis anteriores ao tratamento. Lavar com água da rede, ao final do armazenamento, foi tão efetivo quanto o uso de sanitizantes estudados.

Santos *et al.* (2012) verificaram que o uso de solução de água sanitária com 200 ppm de cloro ativo reduziu a carga microbiana inicial de bactérias heterotróficas, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* após 15 minutos de imersão, entretanto não foi eficiente para diminuir a carga de coliformes totais, fungos filamentosos e leveduras. Concluíram que a forma doméstica de utilização da água sanitária, recomendada

em cartilhas distribuídas aos consumidores brasileiros, não é eficiente para higienizar as alfaces contaminadas com coliformes, fungos e/ou *Escherichia coli*.

4.2 Resultados das análises sensoriais

O público que participou das avalições sensoriais apresentou o consumo segundo as classes seguintes: 1 vez ao mês: 27%; 1 vez a cada quinze dias: 18,5%; 1 vez por semana: 19,7%; 2 vezes por semana: 9% e acima de 2 vezes por semana: 25,6%.

Apesar da pergunta realizada ter sido com referência ao consumo de alface orgânica, poucos participantes afirmaram que não consomem alface orgânica, pela falta destas no mercado local.

O resultado da análise sensorial está apresentada na **Tabela 2**.

Os atributos avaliados receberam notas entre 6,3 e 8 no dia 2 e verificou-se uma tendência de queda nas notas ao longo dos 9 dias de armazenamento para todos os tratamentos e atributos exceto para odor, aspecto geral e intenção de compra para o tratamento DI, e integridade da folha para os tratamentos DI e SL. Porém, mesmo após 9 dias de armazenamento sob refrigeração as notas foram superiores a 5 para todos os tratamentos e atributos.

A comparação entre tratamentos mostrou que no dia 2, logo após a sanitização, o tratramento SL foi menos aceito que os outros, exceto em comparação com o tratamento DI quanto à integridade da folha e intenção de compra. As diferenças entre SL e os outros tratamentos foram se tornando menos significativas ao longo do armazenamento.

Os tratamentos L e OC receberam notas maiores ($p<0,05$) ou pelo menos iguais às dos outros tratamentos para todos os atributos sensoriais ao longo de todo o período de avaliação. O tratamento DI, que apresentou resultados mais estáveis durante o armazenamento, foi em

contrapartida também o tratamento que apresentou notas inferiores ou no máximo iguais aos outros tratamentos para integridade da folha e intenção de compra no dia 2, ou seja, a qualidade foi mantida num nível mais baixo ao longo do armazenamento.

Tais resultados indicam que a aplicação de sanitizantes dicloroisocianurato de sódio dihidratado ou oxicloreto de cálcio na alface não trouxe vantagens em termos da qualidade sensorial em relação ao produto lavado apenas com água, nas condições do estudo.

Tabela 2. Avaliações sensoriais de alface submetidas a diferentes tratamentos de sanitização em três avaliações, aos 2, 4 e 9 dias após colheita.

Atributo	tratamento	Dia 2		Dia 4		Dia 9	
Odor	SL	7,36±2,16	Ab	6,65±2,35	ABb	6,76±2,33	Ba
	L	7,78±2,01	Aab	7,03±2,20	Bab	7,13±2,33	Ba
	DI	7,56±2,06	Aab	7,60±1,97	Aa	7,36±2,22	Aa
	OC	7,98±1,81	Aa	7,03±2,11	Bab	7,21±2,22	Ba
Integridade da folha	SL	6,94±2,45	Ac	6,55±2,49	Aa	6,31±2,45	Ab
	L	7,87±1,89	Aab	6,96±2,10	Ba	6,61±2,30	Bab
	DI	7,38±2,30	Abc	6,85±2,50	Aa	7,24±2,31	Aa
	OC	8,00±1,71	Aa	6,58±2,33	Ba	6,76±2,48	Bab
Frescor	SL	6,53±2,47	Ab	5,95±2,33	ABa	5,69±2,59	Bb
	L	7,43±2,10	Aa	6,34±2,17	Ba	6,43±2,38	Bab
	DI	7,17±2,28	Aa	6,13±2,67	Aba	6,52±2,59	Ba
	OC	7,66±1,84	Aa	6,23±2,53	Ba	6,06±2,72	Bab
Aspecto geral	SL	6,54±2,37	Ac	6,18±2,19	ABa	5,85±2,31	Bb
	L	7,55±1,83	Aab	6,36±2,14	Ba	6,55±2,00	Ba
	DI	7,15±2,21	Ab	6,59±2,32	Aa	6,81±2,34	Aa
	OC	7,80±1,73	Aa	6,36±2,25	Ba	6,34±2,29	Bab
Intenção de compra	SL	6,34±2,76	Ac	5,87±2,69	ABa	5,31±2,75	Bb
	L	7,53±2,07	Aab	6,20±2,37	Ba	6,06±2,68	Bab
	DI	6,89±2,62	Abc	6,17±2,68	Aa	6,29±2,91	Aa
	OC	7,70±2,02	Aa	6,00±2,70	Ba	5,84±2,87	Bab

A, a: Médias seguidas de letras diferentes (maiúsculas) indicam diferença estatística a p<0,05 entre dias da avaliação para o mesmo tratamento (leitura horizontal). Médias seguidas de letras diferentes (minúsculas) indicam diferença estatística a p<0.05 entre tratamentos para o mesmo dia de avaliação (leitura vertical).

5. Conclusões

O uso de sanitizantes em alface promove redução de microrganismos imediatamente após a aplicação, porém durante o armazenamento sob refrigeração os níveis de algumas classes de microrganismos podem novamente se elevar.

A utilização de sanitizantes não traz benefícios marcantes quanto à preservação das qualidades sensoriais da alface durante o armazenamento.

Para a descontaminação da alface pode-se realizar a lavagem em água de boa qualidade para armazenar os vegetais em ambiente refrigerado e realizar a sanitização imediatamente antes do consumo.

6. Referências Bibliográficas

BRASIL. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009b. **Instrução Normativa nº 18,** de 28 Regulamento técnico para o processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 maio 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011a. **Instrução Normativa nº 24,** de 01 de junho de 2011, acrescidos na tabela do Anexo III (Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia Permitidos no Processamento de Produtos de Origem Vegetal e Animal Orgânicos). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 01 jun. 2011.

DAROLT, M. R. **Comparação entre a qualidade do alimento orgânico e convencional**. In: Instituto Agronômico do Paraná, 2003. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/OrgConvenc.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2013.

DAVIDSON, G. R.; BUCHHOLZ, A. L.; RYSER, E. T. Efficacy of commercial produce sanitizers against nontoxigenic Escherichia coli O157:H7 during processing of iceberg lettuce in a pilot-scale leafy green processing line. **Journal of Food Protection**, *76*(11), 1838–45. 2013. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-111

DOMENÉCH, E. et al. The role of the consumer in the reduction of *Listeria monocytogenes* in lettuces by washing at home**. Food Control, Kidlington,** v. 29, p. 98e-102e, 2013.

GIL, M. I. et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 134, p. 37-45, 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Improving food safety through a one health approach, 2012.** Washington, DC: National Research Council, The National Academic Press, 2012. 418 p. Disponível em: <http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=13423&page=R2>. Acesso em: 08 abr. 2013.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. Florida: CRC Press, 1987. v. 2, 158 p.

MEYNERS, M.; CASTURA, J. C.; CARR, B. T. Existing and new approaches for the analysis of CATA data. **Food Quality and Preference**, *30*(2), 309–319. 2013. doi:10.1016/j.foodqual.2013.06.010

MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. São Carlos: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, *464*(7285), 59–65. 2010. doi:10.1038/nature08821

SANTOS, T. B. A.; SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; PEREIRA, J. L. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal of Food Technology**, *13*(02), 141–146. 2010. doi:10.4260/BJFT2010130200019

SANTOS, H. D. S. et al. Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces, **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** *71*(1), 56–60. 2012.

SOENDJOJO, A. et al. IS local produce safer ? **Journal of Purdue Undergraduate Research,** West Lafayette, v. 2, p. 54–63, 2012. doi:10.5703/jpur.02.1.09.

TOMPKIN, R. B. Control of Listeria monocytogenes in the food-processing environment. **Journal of food protection**, *65*(4), 709–25. 2002.

VENNERIA, E. et al. Effect of harvest time and minimal processing on nutritional and microbiological quality of three leaf crops. **Journal of Agriculture and Biodiversity Research,** Nigeria, v. 1, n. 1, p. 11–17, 2012.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. 215 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. Nature reviews. **Microbiology**, Berks, v. 10, n. 12, p. 828–840. 2012. Doi:10.1038/nrmicro2910.

CAPÍTULO IV

Influência da certificação orgânica, preço e conveniência na decisão de compra de alface orgânica minimamente processada

RESUMO

RIZZO, D. L. **Influência da certificação orgânica, preço e conveniência na decisão de compra de alface orgânica minimamente processada**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A alface (*Lactuca sativa L.)* é o vegetal folhoso mais consumido no Brasil. O cultivo pode ser realizado em sistema orgânico e convencional. Produtos orgânicos tem alcançado uma grande aceitação, apesar dos preços mais elevados em comparação com produtos convencionais, e o termo orgânico não é muito compreendido pelos consumidores. Este estudo teve o objetivo de verificar como os parâmetros preço, presença de selo de certificação e conveniência afetam a decisão de compra de alface orgânica minimamente processada pelos consumidores. Foi utilizada a técnica *Conjoint Analysis,* na qual 3 parâmetros em 2 níveis geraram 8 tratamentos. Os tratamentos foram representados em 8 cartões numerados com três dígitos codificados, com imagens de pacotes de alface que foram apresentados aos consumidores em ordem aleatória, monadicamente. Foram caracterizados os seguintes fatores: presença ou ausência de selo oficial de orgânicos; preços de R$ 3,30 e R$ 5,50; pronto para consumo ou necessidade de lavar antes do consumo. Foram conduzidos dois estudos: 1-pesquisa presencial com 70 respondentes, no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP e Centro Paula Souza, ambos em Pirassununga/SP, e na cidade de Ribeirão Claro/PR; 2-pesquisa via internet, dirigida a 60 consumidores cujo consumo de produtos orgânicos e conhecimento do sistema de produção é elevado, sendo a maioria pertencente a ACOPA (Associação de Consumidores de Produtos Orgânicos do Paraná). Na pesquisa via internet, os tratamentos continham o selo oficial Orgânico Brasil e a presença ou ausência do selo da certificadora. Para avaliar a intenção de compra foi utilizada a escala híbrida variando de 0 (definitivamente não compraria) a 10

(definitivamente compraria). A análise estatística dos resultados foi feita por meio de análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey(p=0,05) para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos, e utilizou-se também a *Conjoint Analysis* para avaliar a influência dos parâmetros preço, conveniência e presença de selo. Os dados mostraram que cerca de um terço dos respondentes consomem alface orgânica mais de duas vezes por semana. Para a pesquisa presencial, os dados demonstraram que o tratamento que apresentava o menor preço, selo orgânico oficial e pronto para consumo foi significativamente melhor avaliado quanto à intenção de compra ($p<0,05$). Na *Conjoint Analysis* as importâncias relativas determinadas para os parâmetros foram 15,85% para selo, 49,49% para o preço e 34,66% para conveniência, indicando a prevalência do preço na maior aceitação pelos provadores. Para a pesquisa via internet, os tratamentos com menor preço, com ou sem selo da certificadora apresentaram as maiores médias ($p<0,05$) em relação à intenção de compra, não importando se eram prontos para consumo ou não. As importâncias relativas foram 32,4% para selo da certificadora, 57,3% para preço 10,3% para conveniência. Os resultados demonstram que um público com maior informação sobre a produção orgânica valoriza a presença de selo de certificação, dando menor valor a conveniência, comparado a grupos que não têm um conhecimento significativo sobre a produção orgânica.

Palavras chaves: Conjoint Analysis, aceitação sensorial, atitude do consumidor

ABSTRACT

RIZZO, D. L. **Effect of organic certification, price and convenience on purchase decision of minimally processed organic lettuce.** Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Lettuce (*Lactuca sativa* L.*)* is the most consumed leafy vegetable in Brazil. Conventional or organic farming methods can be employed in its production. Organic product have achieved a high acceptance, despite the higher prices when compared to conventionally grown produce and the fact that consumers are unaware of the real meaning of the term "organic". The objective of this study is to determine the influence of the parameters price, organic certification and convenience affect consumer buying decision of minimally processed organic lettuce. A *Conjoint Analysis* was performed with 3 parameters at 2 levels which generated 8 treatments. Cards with packaged lettuce images were prepared for each one of the 8 treatments coded by a three digit number and presented monadically to consumers in random order. The following factors were analyzed: presence or not of an official organic certification logo; prices of R$ 3.30 or R$ 5.50 and either "ready to eat" or "need to wash before consumption". Two separate studies were conducted: 1-a direct survey with 70 consumers, at the Sensory Analysis Laboratory of the Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP and Centro Paula Souza, both in Pirassununga/SP, and at the city of Ribeirão Claro/PR; 2- internet survey, sent to 60 consumers of organic products who know about the production system, mostly belonging to ACOPA (Association of Organic Product Consumers of Paraná). In the internet survey the treatments contained the official logo "Orgânico Brasil" and the presence or not of a certification logo. A hybrid scale varying from 0 (definitely would not buy) to 10 (definitely would buy) was used to evaluate buying intention. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test (p=0.05)

to determine significant differences between treatments, and *Conjoint Analysis* to evaluate the influence of price, convenience and organic certification. Results show that approximately one third of the consumers eat organic lettuce more than twice a week. In the direct survey buying intention was significantly higher ($p<0.05$) for lower price, official organic logo and "ready to eat". *Conjoint Analysis* determined that the relative importance of each parameter was 15.85% for logo, 49.49% for price and 34.66% for convenience, indicating that price was the most relevant factor for consumer choice. In the internet survey lower priced treatments, with or without a certification logo, presented higher buying intention average grades ($p<0.05$), regardless of convenience. In this case the relative importance of the factors was 32.4% for certification logo, 57.3% for price and 10.3% for convenience. Therefore consumers with more information about the organic farming system are more concerned with the presence of a certification logo, with low regard for convenience as opposed to groups that are not so well informed about the cultivation system.

Keywords: Conjoint Analysis, sensory acceptance, consumer behavior

1. Introdução

Pesquisas indicam que a percentagem de consumidores que decide suas compras no ponto de venda é de 70% e o tempo médio de observação de uma determinada categoria de produtos pode ser de apenas dez segundos. Numa gôndola observada pelo consumidor, mais de um terço dos produtos são totalmente ignorados (SALMASI e MARTINELLI, 1998). Fatores como marca, tipo e cor de embalagem, informações do rótulo e preço, entre outros, influenciam a decisão de compra.

Produtos orgânicos tem alcançado uma grande aceitação pelos consumidores e mercado garantido apesar dos preços mais elevados (EMBRAPA, 2007). Smolinski, Guerreiro e Raiher (2011) entrevistaram 100 pessoas e todas estavam dispostas a pagar pelo menos 10% a mais pelos produtos orgânicos; 70% pagariam 20% a mais; com valor acima de 50% apenas 22% dos entrevistados estariam dispostos a pagar por produtos orgânicos, e apenas 8% estariam dispostos a pagar um percentual de 100% a mais. Verifica-se que é importante que os produtos orgânicos sejam facilmente reconhecidos pelos consumidores, os quais podem ou não estar dispostos a pagar determinado acréscimo no preço em função das características do produto.

Neste sentido, a Instrução normativa nº 19, de 28 de maio de 2009, instituiu no seu artigo 2, item X, o selo do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, como sendo a marca visualmente perceptível que identifica e distingue produtos controlados no Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, bem como garante a conformidade dos mesmos com os regulamentos técnicos da produção orgânica (BRASIL, 2009).

No entanto, estudos revelam que grande parte dos consumidores não diferencia corretamente o produto orgânico do convencional. Dantas *et al.* (2005) observaram que consumidores pagariam mais pela

couve sem produtos químicos e não pagariam mais pela couve orgânica, revelando que o termo orgânico não foi bem compreendido pelos consumidores, apesar do alto grau de instrução (81% com nível superior). Os autores concluíram claramente que há necessidade de informar e orientar o consumidor sobre o significado de produto orgânico, ressaltando suas vantagens e características. Este estudo indica que o consumidor dificilmente possui informação suficiente sobre os temas técnicos da produção de orgânicos, assim como conhecimento das normas legais para a tomada de decisão de compra. O assunto é complexo mesmo para técnicos que atuam no setor devido à interação de fatores ambientais, do sistema de produção, da comercialização e da legislação pertinente. Deste modo, são necessários mais estudos na área da produção e consumo de alimentos orgânicos para dar suporte técnico aos agricultores que se dedicam a esta produção.

Atributos sócio demográficos são frequentemente usados para segmentação de consumidores, porém estudos como os de Soares, Deliza e Oliveira (2008) e de Hoppe (2012) indicam que as variáveis sócio demográficas não são influentes na predição do consumo de produtos orgânicos. Técnicas projetivas como a Associação de Palavras e a aplicação de escalas de atitude, assim como a avaliação de escolhas do consumidor baseadas na técnica da *Conjoint Analysis*, podem, por outro lado, trazer informações relevantes quanto ao comportamento do consumidor em relação a um produto ou conceito.

Para a questão de segurança alimentar, o consumidor não possui informações suficientes e simplificadas, e muitas vezes o produto orgânico é considerado mais seguro que o convencional em relação à contaminação microbiológica. Em estudo de Rezende (2003) sobre a qualidade de tomate orgânico, 78% dos entrevistados afirmaram que confiam plenamente na total ausência de contaminantes. O estudo também revelou que 44,9% dos entrevistados não têm nenhum cuidado

especial antes do consumo e 90,7% utilizam vinagre na descontaminação.

Técnicas de análise sensorial tais como a Associação de Palavras e *Conjoint Analysis* fornecem informação sobre como características de embalagem influenciam tanto a intenção de compra como também as expectativas sensoriais criadas nos provadores (ARES e DELIZA, 2010a). Os autores também comentam que os testes representam tarefas simples para os provadores e podem ser úteis na etapa de *design* de embalagens, de forma a assegurar que a embalagem crie expectativas adequadas em relação ao produto.

A alface (*Lactuca sativa* L.) é o vegetal folhoso mais consumido no Brasil, sendo o componente básico de saladas preparadas no ambiente doméstico ou em refeições comerciais (EMBRAPA, 2006; SALA e COSTA 2012). A alface pode ser cultivada no sistema convencional ou orgânico e comercializada inteira ou minimamente processada, sendo, portanto um ótimo modelo para estudo do comportamento do consumidor em relação ao efeito de informações descritas na embalagem, especificamente, preço, conveniência e certificação na sua decisão de compra de produtos orgânicos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a importância dos parâmetros preço, praticidade e certificação orgânica do produto alface orgânica processada minimamente na tomada de decisão de compra do consumidor.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar dois grupos distintos de consumidores, diferenciados segundo o nível de conhecimento sobre o sistema de produção orgânica e suas normas técnicas, em relação à importância dada aos parâmetros preço, conveniência e certificação na decisão de compra de alface orgânica;
- Levantar e avaliar as classes de palavras associadas ao produto alface orgânica minimamente processada;
- Avaliar a influência de atributos socioeconômicos e de consumo na decisão de compra de alface orgânica;

3. Material e Métodos

Foram realizadas duas etapas de trabalho, sendo a primeira etapa com 70 consumidores - 50 consumidores da cidade de Pirassununga/SP e 20 consumidores da cidade de Ribeirão Claro/PR - e uma segunda etapa realizada por meio de pesquisa via internet, dirigida a 60 consumidores, em sua maioria membros da Associação de Consumidores de Produtos Orgânicos do Paraná (ACOPA) ou indicados por estes.

A *Conjoint Analysis* foi utilizada com o objetivo de se entender a complexidade do processo de escolha e decisão de compra, denominada estrutura de preferência dos consumidores (SILVA e BASTOS 2010), e foi aplicada aos resultados das duas etapas. A técnica de associação de palavras foi utilizada para verificar os aspectos que o consumidor mais relaciona ao produto orgânico, com os 70 consumidores do grupo da primeira etapa. Além disso, foi utilizada escala de atitude sobre consumo de orgânicos, descrita em Soares, Deliza e Gonçalves (2006), para 50 consumidores da cidade de Pirassununga, participantes da pesquisa da primeira etapa.

3.1 Estímulos

Foram elaboradas imagens de embalagens com as principais informações levantadas pela literatura, como importantes ao consumidor, quais sejam: marca, fabricante, endereço, SAC, peso, data de fabricação e validade; instrução de uso, composição nutricional, tipo de produção; foto do produto e preço.

Foram apresentados aos consumidores oito cartões com imagens de embalagens de alface orgânica gerados da combinação de 3 fatores e 2 níveis, de acordo com planejamento da *Conjoint Analysis* **(Tabela 3).**

Tabela 3. Fatores e níveis dos estímulos na *Conjoint Analysis*

Instrução de uso	Selo Orgânico Brasil ou selo da certificadora	Preço
Lavar e higienizar antes do consumo	Presente	Alto R$ 5,50
Produto higienizado, pronto para consumo.	Ausente	Baixo R$ 3,30

Os preços foram fixados conforme pesquisa de internet em site de busca de preços, onde ocorreu uma grande variabilidade de apresentação de embalagens, sendo com maior frequência a embalagem de 200 g. O selo utilizado é governamental para produtos orgânicos, conforme normativa do governo federal, segundo IN 19/2009 (BRASIL, 2009).

A **Figura 20** apresenta um dos cartões com a alface de menor preço, com selo orgânico oficial e pronto para consumo.

Figura 20. Embalagem de alface minimamente processada (pesquisa presencial)

A embalagem de alface para o trabalho de pesquisa da segunda etapa, com os consumidores de orgânicos, foi acrescida do selo de auditoria, que, no caso, se trata da TECPAR-Instituto de Tecnologia do Paraná, que faz a certificação dos produtos da APO-Associação de Agricultores de Produtos Orgânicos de Ribeirão Claro. A **Figura 21** representa a embalagem utilizada na pesquisa.

Figura 21. Embalagem de alface processada com selo de auditoria (pesquisa internet)

3.2 Escala utilizada

Foi utilizada a escala híbrida (VILLANUEVA, PETENATE e SILVA, 2005; VILLANUEVA e SILVA, 2009) com notas de 0 (certamente não compraria) até 10 (certamente compraria).

3.3 Questionário de atitude sobre produtos orgânicos

Os 50 participantes da cidade de Pirassununga receberam um questionário com 17 afirmações sobre produtos orgânicos (SOARES, DELIZA e GONÇALVES, 2006) e uma escala de 10 pontos com o "Eu discordo completamente" (valor 0) e "Eu concordo completamente" (valor 10). O questionário é apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Questionário sobre atitude sobre produção orgânica

Consequências da compra de orgânicos (ao comprar alimentos orgânicos é possível ....)
1. Melhorar o estado geral do meio ambiente.
2. Melhorar as circunstâncias e a saúde dos animais de criação.
3. Melhorar tanto minha saúde como a de minha família.
4. Tornar-me uma pessoa mais consciente.
5. Evitar riscos que possam estar associados a ingestão de alimentos não orgânicos.
6. Reduzir o uso de fertilizantes artificiais na agricultura.
7. Reduzir a eutrofização de lagos e curso de água.
8. Reduzir a poluição do solo.
9. Reduzir o transporte de alimentos.
10. Reduzir o uso de petróleo e outras fontes não renováveis.
11. Reduzir a quantidade de perdas.
12. Reduzir o buraco de ozônio na atmosfera.
13. Preservar a biodiversidade na natureza.
14. Reduzir o emprego de herbicidas e pesticidas na agricultura.
15. Reduzir o uso de medicamentos dos animais de criação.
16. Dar às minhas crianças uma alimentação melhor.
17. Reduzir o risco de doenças na minha família.

Fonte: Soares, Deliza & Gonçalves (2006)

	0_•_•_•_•_5_•_•_•_•_10	
Eu discordo completamente		Eu concordo plenamente

3.4 Aplicação dos questionários aos participantes

O estudo foi conduzido em Pirassununga, no laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP e no Centro Paula Souza. Também foram avaliados consumidores da Cidade de Ribeirão Claro/PR, onde existe a APO –

Associação de Produtores Orgânicos de Ribeirão Claro, que fornece produtos orgânicos no comércio local.

A avaliação com 70 participantes foi realizada com as imagens das embalagens de alface em oito cartões numerados, com três dígitos codificados, apresentados em ordem balanceada, monadicamente; para que cada avaliador registrasse sua nota de avaliação em escala híbrida. Foi solicitada também a tarefa de associação de palavras, na qual os participantes, ao avaliar cada cartão, um de cada vez, foram solicitados a escrever as primeiras quatro imagens, pensamentos ou sentimentos que viessem à mente quando da observação da embalagem. Foi solicitado o perfil socioeconômico e educacional de cada participante.

Para a pesquisa dirigida, realizada por internet, com 60 consumidores de orgânicos, utilizou-se uma apresentação elaborada em programa Powerpoint (Microsoft Office – Windows) com as 8 embalagens, identificadas com código de 3 dígitos. As apresentações foram confeccionadas com o balanceamento da ordem de apresentação. Os participantes foram orientados a avaliar as embalagens na ordem enviada, utilizando a escala híbrida descrita no **item 3.2**. Após a avaliação, os participantes foram convidados a acessar o site de pesquisa realizado no Surveypie para postar as repostas (http://www.surveypie.com/my/homepage?verify=1). Neste site os consumidores, além da avaliação responderam o questionário sócio econômico.

4. Resultados e discussão

4.1 Dados socioeconômicos dos entrevistados

A distribuição dos participantes em relação à frequência de consumo, sexo, idade, escolaridade e renda levantada por meio de questionário socioeconômico e de consumo está apresentada na **Tabela 5**. O primeiro dado se refere à pesquisa presencial com 70 participantes e o segundo dado se refere à pesquisa via internet com 60 respondentes.

Tabela 5. Características dos participantes na avaliação de alface orgânica. O primeiro dado se refere à pesquisa presencial e o segundo dado se refere à pesquisa via internet.

Consumo (%)	Sexo (%)	Idade (%)	Escolaridade (%)	Salários mínimos (%)
1xmês: 29 e 12	**Masculino:** 31 e 55	**Até 20 anos:** 41 e 0	**Fundamental:** 4 e 0	**Até 5 SM:** 51 e 13
1x15 dias: 16 e 13	**Feminino:** 69 e 45	**De 20 a 40 anos:** 39 e 2	**Médio:** 50 e 0	**De 5 a 10 SM:** 40 e 38
1xsemana: 13 e 23		**De 40 a 60 anos:** 19 e 72	**Superior:** 36 e 100	**De 10 a 20 SM:** 9 e 48
2xsemana: 9 e 17		**Mais 60 anos**: 1 e 8		
Mais de 2xsemana: 34 e 35				

Para o grupo da pesquisa presencial, jovens com até 20 anos e com nível escolar médio foi a maior categoria, fato que pode ser explicado pelo local onde foi realizada a pesquisa – escola técnica e faculdade na cidade de Pirassununga. O nível superior foi 100% para os participantes da pesquisa via internet, uma vez que um número elevado dos membros da ACOPA são técnicos que atuam no setor de produção orgânica. Percebe-se que o consumo de mais de duas vezes por semana foi a maior classe de participantes nos grupos pesquisados, cerca de um terço dos entrevistados.

4.2 Valores de intenção de compra atribuídos aos tratamentos nas pesquisas presencial e via internet

Na pesquisa presencial, os dois tratamentos melhor avaliados, com notas superiores a 7, apresentavam o produto alface orgânica com menor preço, com ou sem selo orgânico oficial e pronta para consumo. Estes tratamentos não diferiram significativamente entre si no nível de 5% de significância. Os tratamentos menos aceitos foram aqueles com maior preço e necessidade de lavar antes do consumo, os quais não diferiram do tratamento com maior preço, sem selo e pronto para consumo **(Tabela 6).** Estes resultados demonstram uma preferência dos participantes por um produto que ofereça preço baixo e conveniência, enquanto que a certificação de orgânico é colocada em segundo plano.

Tabela 6. Médias de intenção de compra para tratamentos de alface minimamente processada obtidas na pesquisa presencial (letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey).

Tratamento	Avaliação
R$ 3,30/com selo orgânico Brasil/pronto para consumo (3CSP)	7,9**a**
R$ 3,30/sem selo orgânico Brasil/pronto para consumo (3SSP)	7,1**ab**
R$ 3,30/com selo orgânico Brasil/lavar antes do consumo (3CSNP)	6,5 **bc**
R$ 5,50/com selo orgânico Brasil /pronto para consumo (5CSP)	6,1 **c**
R$ 3,30/sem selo orgânico Brasil /lavar antes do consumo (3SSNP)	6,1 **c**
R$ 5,50/sem selo orgânico Brasil /pronto para consumo (5SSP)	5,6 **cd**
R$ 5,50/com selo orgânico Brasil /lavar antes do consumo (5CSNP)	5,0 **d**
R$ 5,50/sem selo orgânico Brasil /lavar antes do consumo (5SSNP)	4,8 **d**

Na **Tabela 7** verificam-se os resultados da pesquisa via internet com o público consumidor de orgânicos, onde todos possuem nível superior de educação. Os tratamentos com selo da certificadora e menor preço diferiram estatisticamente ($p<0,05$) dos demais. Observa-se que esse público valoriza o preço, porém também valorizam o selo da certificadora nos tratamentos de menor preço. Os tratamentos com preços mais altos e sem selo da certificadora foram os que

apresentaram menores ($p<0,05$) valores de intenção de compra (notas inferiores a 4).

Tabela 7. Médias de intenção de compra para tratamentos de alface orgânica minimamente processada obtidas na pesquisa via internet (letras diferentes indicam diferença significativa, a 5% pelo Teste de Tukey).

Tratamento	Avaliação
R$ 3,30/com selo CERTIFICADORA/pronto para consumo (CSP3)	7,6**a**
R$ 3,30/com selo CERTIFICADORA/lavar antes do consumo (CSNP3)	7,1**a**
R$ 3,30/sem selo Certificadora/pronto para consumo (SSP3)	5,7 **b**
R$ 3,30/sem selo Certificadora/lavar antes do consumo (SSNP3)	5,4 **b**
R$ 5,50/com selo CERTIFICADORA /pronto para consumo (CSP5)	4,6 **bc**
R$ 5,50/com selo CERTIFICADORA /lavar antes do consumo (CSNP5)	4,1 **cd**
R$ 5,50/sem selo Certificadora /pronto para consumo (SSP5)	3,4 **de**
R$ 5,50/sem selo Certificadora/lavar antes do consumo (SSNP5)	2,7 **e**

A importante influência do preço e do selo de certificação de orgânico na intenção de compra também foi verificada por Dantas (2001) que avaliou o impacto de cinco atributos da embalagem de couve minimamente processada, na preferência dos consumidores. O tipo de produção, a cor do rótulo e o preço foram os atributos que afetaram significativamente a intenção de compra, enquanto a visualização do produto fornecida pela embalagem não proporcionou alterações no julgamento. Rezende (2003) relatou o comportamento do consumidor em relação ao consumo de tomate orgânico, onde o atributo selo ficou em quarto lugar na ordem de importância. Neste caso, tal fato pôde ser explicado pela confiança do consumidor nos produtos vendidos na feira e comercialização a granel.

Na pesquisa via internet, vários consumidores enviaram comentários dando relevância ao ato de comprar diretamente do produtor e ao de preparar o próprio alimento.

4.1 Análise de componentes principais

Pesquisa presencial

A análise de componentes principais (ACP) é uma avaliação estatística multivariada, isto é, analisa as variáveis de forma conjunta. A ACP identifica das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações e transforma um conjunto original de variáveis em outro conjunto: os componentes principais (CP) ou fatores de dimensões equivalentes. Essa transformação, em outro conjunto de variáveis, ocorre com a menor perda de informação possível, sendo que esta também busca eliminar algumas variáveis originais que possuam pouca informação. Ainda pretende-se determinar as variáveis de maior influência na formação de cada componente, que serão utilizadas para estudos futuros, tais como de controle de qualidade, estudos ambientais, estudos populacionais entre outros (VICINI, 2005).

Nos gráficos resultantes da ACP os tratamentos aplicados à alface aparecem representados como vetores e os participantes como pontos **(Figura 22-A e B**). A posição relativa entre os vetores origina informações importantes na ACP, sendo que vetores próximos indicam tratamentos avaliados de forma similar pelos participantes. Adicionalmente os participantes também se localizam próximos dos tratamentos que melhor avaliaram. As percentagens para cada fator indicam quanto cada fator explica da variabilidade na intenção de compra entre os tratamentos. Para que inferências possam ser feitas baseadas apenas na representação de dois fatores a soma das percentagens deve ser alta.

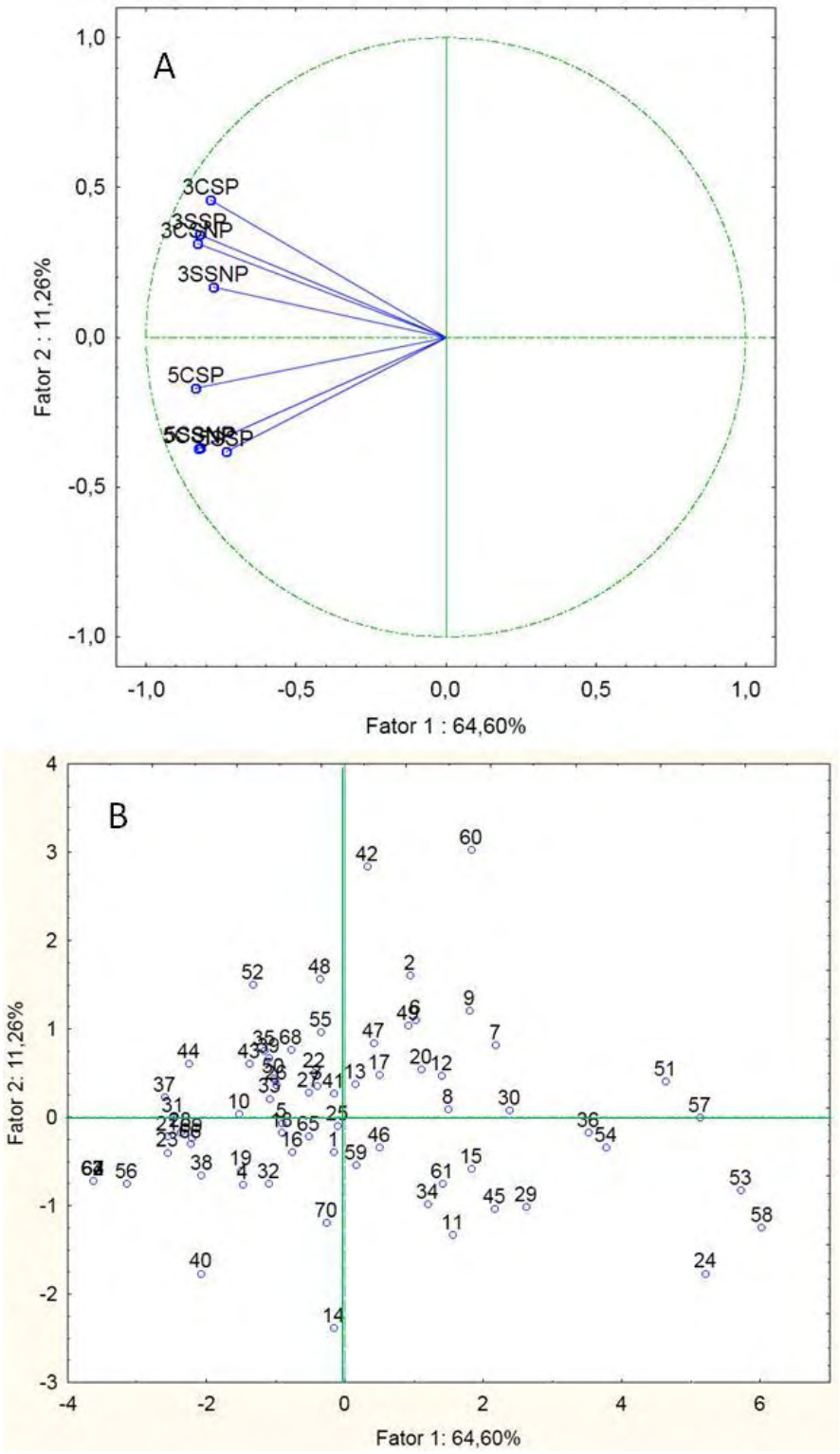


Figura 22. Gráficos da Análise de Componentes Principais aplicada aos resultados da pesquisa presencial. A – Localização dos tratamentos no mapa bidimensional, B – Localização dos provadores. O significado dos códigos dos tratamentos está descrito na Tabela 6.

Na análise de componentes principais da pesquisa presencial os fatores 1 e 2 representaram 64,60% e 11,26% da variabilidade na intenção de compra, respectivamente, num total de 71,86% da variabilidade, valor relativamente alto para dados de análise sensorial. O fator 1 representa a variabilidade entre os tratamentos em função da intenção de compra. Verificou-se uma distribuição dos tratamentos no lado esquerdo do gráfico, com um clara divisão dos tratamentos em dois blocos separados em função do preço, ficando os tratamentos com menor preço no quadrante superior e os de maior preço no quadrante inferior (**Figura 22A**). Tal distribuição demonstra que o fator 2 representa a variabilidade dos tratamentos em função do preço.

Na **Figura 22B** verifica-se a distribuição dos participantes, que indica que muitos deles atribuíram valores de intenção de compra baixos para todos os tratamentos uma vez que aparecem no lado oposto aos tratamentos. Observa-se também que não houve uma segmentação clara entre consumidores que preferiram os tratamentos com maior ou menor preço uma vez que há um número semelhante de provadores nos quadrantes superior e inferior esquerdo, e vários provadores próximos ao cruzamento dos eixos.

Para verificar a influência dos fatores socioeconômicos dos participantes sobre a intenção de compra de alface tais fatores foram analisados como variáveis suplementares e os resultados podem ser observados na **Figura 23**. Os vetores de consumos resultantes são relativamente curtos para a maioria os fatores analisados, indicando que não houve uma influência clara destes fatores socioeconômicos na decisão de compra dos participantes. As categorias consumo de 1 vez ao mês (**Figura 23A**) e idade de 20 a 40 anos (**Figura 23B**) se destacaram com vetores um pouco maiores, o que poderia indicar uma tendência. Observou-se que o vetor de consumo de uma vez ao mês se localiza no quadrante oposto às demais classes de consumo e aos tratamentos, isso

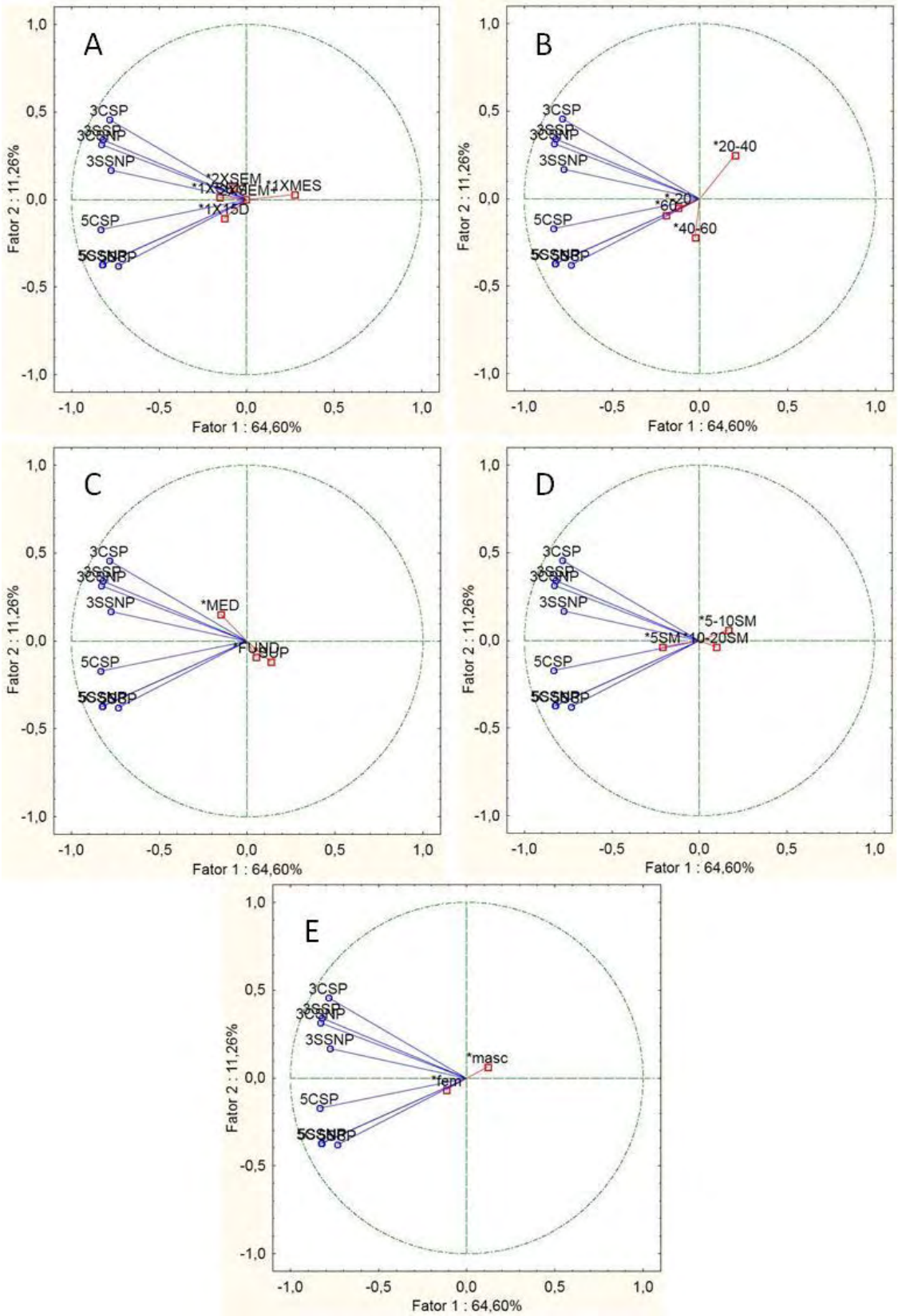
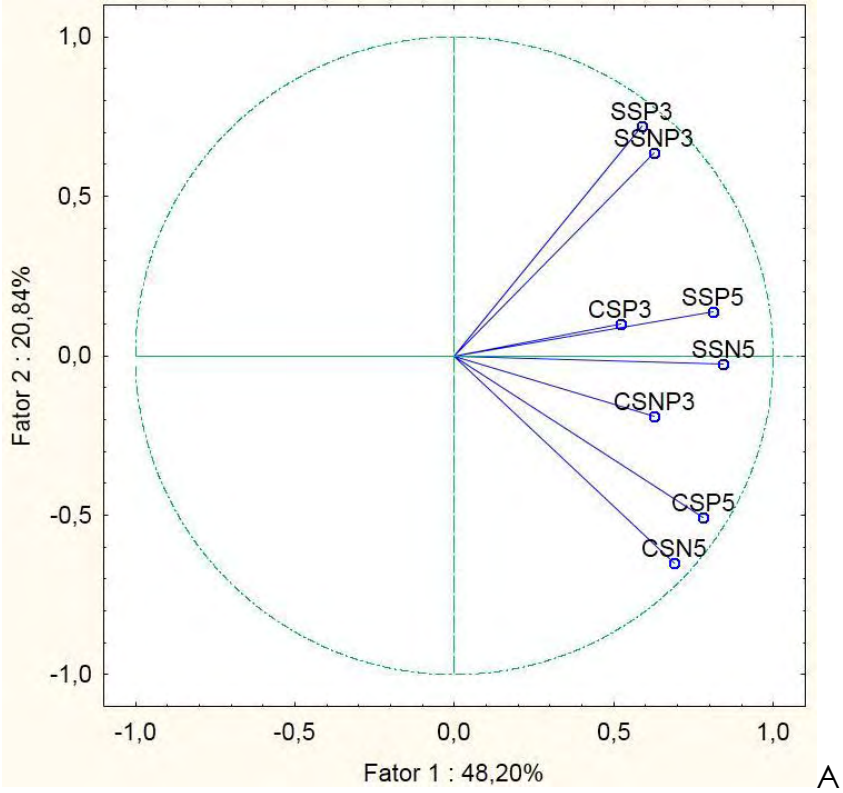


Figura 23. Influência dos fatores socioeconômicos coletados na pesquisa presencial sobre a intenção de compra de alface. A – Frequência de consumo, B – faixa etária, C – Educação, D – Renda, E – sexo. Os significados dos códigos dos fatores socioeconômicos e tratamentos estão descrito nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

indicaria uma tendência de que os consumidores menos assíduos não tenham preferência por qualquer dos tratamentos. A faixa de idade de 20 a 40 anos se localizou no quadrante superior direito, indicando uma tendência dos participantes nesta faixa etária atribuírem menor intenção de compra para os produtos com maior preço, uma vez que o vetor está no quadrante oposto aos tratamentos mais caros. No entanto, verificou-se que não houve interação entre fatores para qualquer das variáveis socioeconômicas, quando realizada a análise de variância da intenção de compra considerando o tratamento e cada fator socioeconômico (**ANEXO 1**).

Pesquisa via internet

Na análise de componentes principais da pesquisa via internet os fatores 1 e 2 representaram 48,20% e 20,84% da variabilidade na intenção de compra, respectivamente, num total de 69,04% da variabilidade. O fator 1 representa a variabilidade entre os tratamentos em função da intenção de compra. Verificou-se uma distribuição dos tratamentos no lado direito do gráfico (lado direito com maiores notas). O fator 2 representa a variabilidade dos tratamentos em função da presença do selo da certificadora e do preço. Houve uma divisão dos tratamentos em três blocos, ficando os tratamentos sem selo e com preço baixo no quadrante inferior direito, e afastados dos tratamentos com selo e preço alto (**Figura 24A**). Os tratamentos com selo e preço baixo e sem selo e preço alto ficaram em localização intermediária. Na **Figura 24B** verifica-se a distribuição dos participantes, que indica que muitos deles atribuíram valores de intenção de compra muito baixos para todos os tratamentos uma vez que aparecem no lado oposto aos tratamentos.



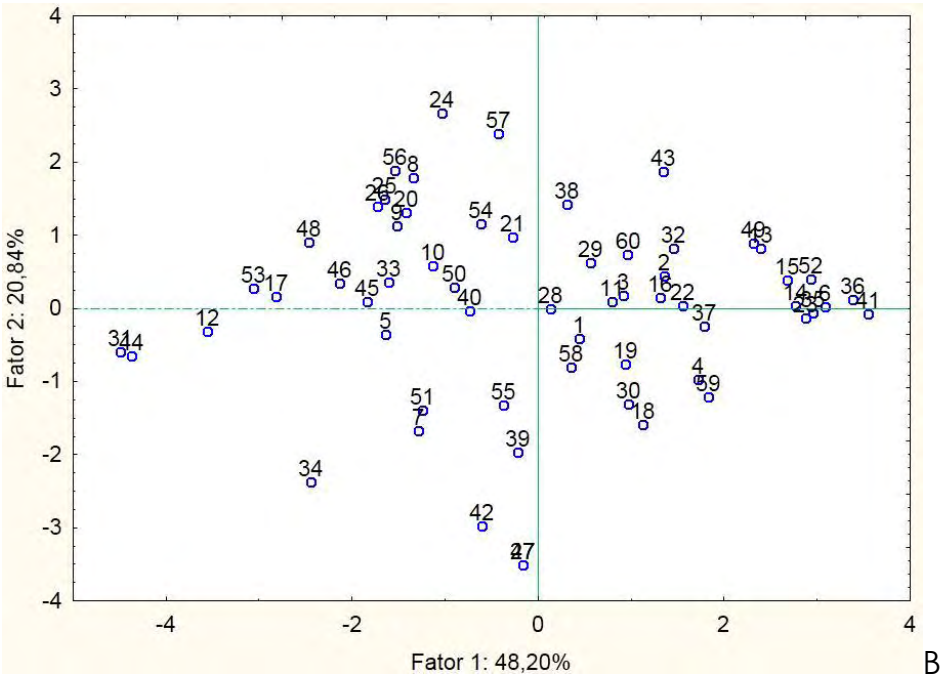


Figura 24. Gráficos da Análise de Componentes Principais aplicada aos resultados da pesquisa via internet. A – Localização dos tratamentos no mapa bidimensional, B – Localização dos provadores. O significado dos códigos dos tratamentos está descrito na tabela 5.

De modo idêntico ao feito na pesquisa presencial os fatores socioeconômicos dos participantes foram analisados como variáveis suplementares e os resultados podem ser observados na **Figura 25**. Os vetores resultantes são relativamente curtos para a maioria os fatores analisados, destacando-se, no entanto, a categoria de idade 60 anos ou mais (**Figura 25C**), o que poderia indicar uma tendência destes consumidores apresentarem uma intenção de compra diferente em relação aos demais. O vetor desta faixa de idade se localizou no quadrante inferior direito, indicando uma tendência dos participantes nesta faixa etária atribuírem maior intenção de compra para os produtos com selo e maior preço.

De fato, quando a análise de variância da intenção de compra considerando o tratamento e cada fator socioeconômico foi realizada verificou-se que houve interação entre fatores apenas para a variável socioeconômica idade (**ANEXO 2**). As pessoas da faixa de idade 60 anos ou mais atribuíram notas mais altas ($p<0,05$) que os outros participantes para os tratamentos CSP5 e CSNP5 e mais baixas ($p<0,05$) para os tratamentos SSNP3 e SSP3

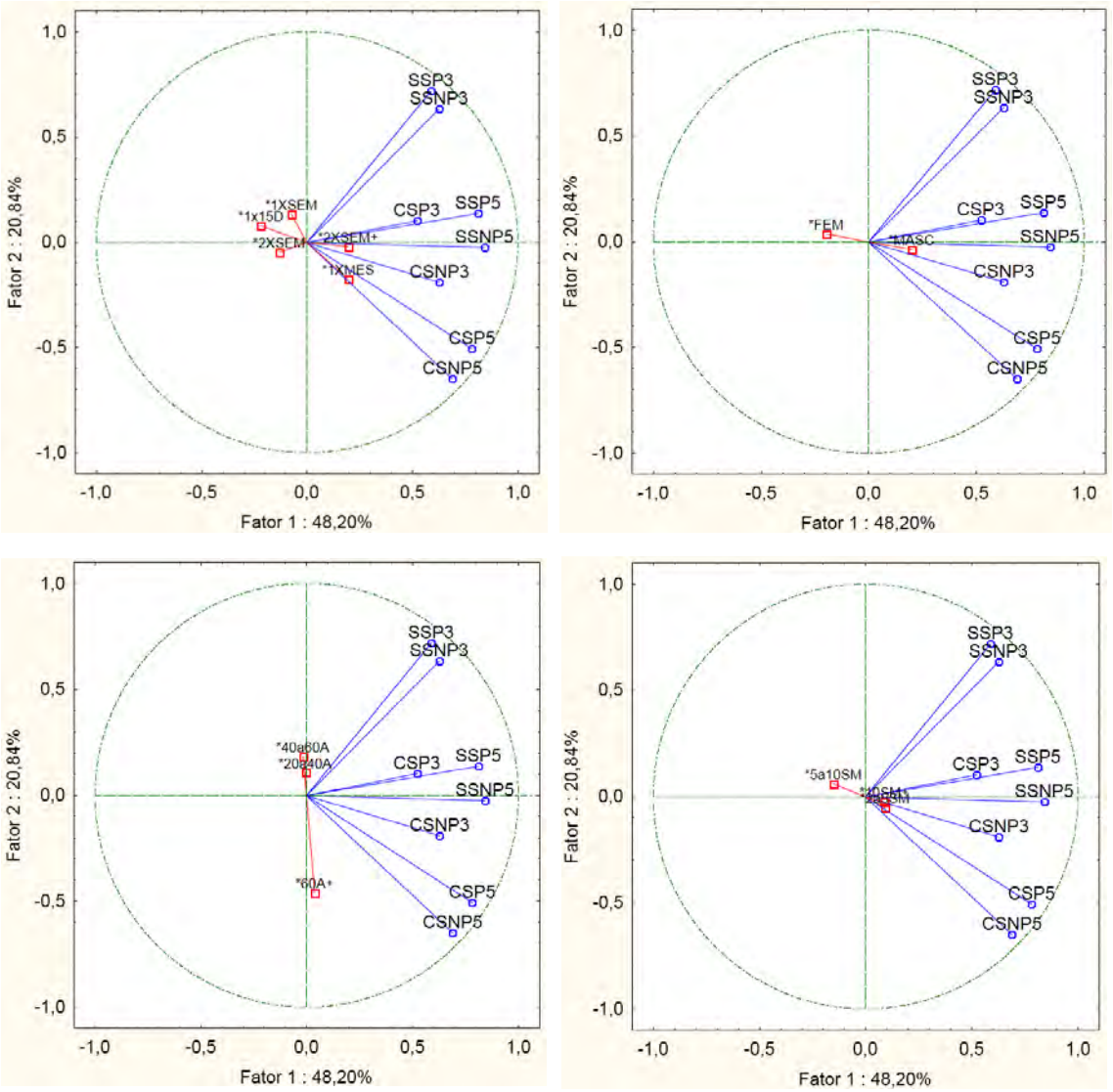


Figura 25. Influência dos fatores socioeconômicos coletados na pesquisa via internet sobre a intenção de compra de alface. Os significados dos códigos dos fatores sócio econômicos e tratamentos estão descrito nas tabelas 3 e 5, respectivamente.

Segundo Villanueva e Silva (2009), a escala híbrida é superior à escala hedônica de nove pontos e escalas auto ajustáveis para gerar mapa de preferência interno (MPI), pois produz um número maior de segmentos e permite melhor caracterização de perfis sócio demográficos e padrão de preferência. A elaboração de MPI exige a seleção de um conjunto de produtos que cubra todo o espectro de

características sensoriais para uma dada categoria de produtos (DUTCOSKY, 2013). Embora não tenha sido proposta deste estudo elaborar um MPI, a ACP permitiu verificar o posicionamento de consumidores por alface orgânica minimamente processada com 8 características diferentes, e, apesar da utilização da escala híbrida, não indicou uma segmentação dos participantes.

Um estudo realizado pela FIESP e IBOPE (2010) mostrou que consumidores estão dispostos a pagar mais por alimentos produzidos por meio de técnicas sustentáveis, porém os resultados do presente estudo indicaram que o selo de certificação de produto orgânico tem menos influência que o preço e a conveniência na decisão de compra. Soares, Deliza e Oliveira (2008), utilizando a técnica de Focus Group, verificaram que vários fatores são determinantes no consumo de vegetais orgânicos: informação, preço, aparência e embalagem. No entanto, informação e preço são mais importantes para os consumidores, independentemente do nível de renda, nível educacional e formação profissional. Os resultados também concordam com Hoppe et al. (2012) que afirmam que variáveis sociodemográficas não são suficientes para explicar o comportamento dos consumidores.

4.2 Resultados da *Conjoint Analysis*

Para a pesquisa presencial, as importâncias relativas dos fatores preço, conveniência e selo estão apresentadas na **Tabela 8.** A importância relativa pode ser interpretada como o impacto ou o efeito que o fator tem sobre a nota de intenção de compra atribuída pelos consumidores aos tratamentos da alface. Observa-se que o preço do produto é o fator que apresenta o maior impacto na intenção de compra com importância relativa de 49,49%, seguido da conveniência e do selo. Infere-se então que os consumidores preferem um produto com preço baixo, com selo oficial de orgânico e pronto para uso.

Tabela 8. Pesquisa presencial: estimativa dos coeficientes de intenção de compra dos níveis de fatores e importância relativa (%) dos fatores

Fatores	Níveis	Coeficientes de intenção de compra (preferência)	Importância relativa (%)
Preço	R$ 3,30	0,7750	49,49
	R$ 5,50	-0,7750	
Conveniência	Pronta para consumo	0,5429	34,66
	Lavar antes consumo	-0,5429	
Selo	Presente	0,2482	15,85
	Ausente	-0,2482	

A estimativa de aumento ou diminuição da nota de intenção de compra do tratamento pode ser obtida somando-se os coeficientes de preferência de seus níveis, portanto para o produto com os fatores mais desejados o valor médio da intenção de compra pode aumentar em 1,5661 e para o produto com as características menos desejadas o valor médio da intenção de compra, pode, inversamente, diminuir em 1,5661.

Os resultados da pesquisa via internet estão apresentados **Tabela 9.**

Tabela 9. Pesquisa via internet: estimativa dos coeficientes de preferencia dos níveis de fatores e importância relativa (%) dos fatores

Fatores	Níveis	Coeficientes de intenção de compra (preferência)	Importância relativa (%)
Preço	R$ 3,30	1,3708	57,32
	R$ 5,50	-1,3708	
Conveniência	Pronta para consumo	0,2458	10,28
	Lavar antes consumo	-0,2458	
Selo Certificadora	Presente	0,7750	32,40
	Ausente	-0,7750	

Avaliando-se a importância relativa sobre a preferência dos consumidores, observa-se que o preço do produto também foi o fator que apresentou o maior impacto na intenção de compra com importância relativa de 57,32%. Infere-se também que os consumidores preferem um produto com preço baixo, com selo oficial da certificadora e pronto para uso, mas a conveniência foi menos importante. Este fato pode estar atrelado a alguns comentários deixados na pesquisa, onde consumidores argumentam que preferem comprar diretamente do produtor e preparar seus alimentos.

Os resultados demonstraram que um público com maior informação sobre a produção orgânica valoriza a presença de selo de certificação, dando menor valor a conveniência, comparado ao grupo com pouco conhecimento sobre a produção orgânica.

Em termos gerais, ambos os grupos apresentaram o fator preço como mais importante na decisão de compra, fato que também é

relatado em outros estudos. Cerda *et al.* (2012) aplicaram a *Conjoint Analysis* para avaliar a importância relativa do preço, variedade, sabor e sistema de produção de maçãs na intenção de compra de consumidores chilenos e verificaram que o preço foi o fator mais importante com um percentual de importância relativa de 44,63%, enquanto que o sistema de produção ficou em terceiro lugar com 20,56%. LOO *et al.* (2013) verificaram que os consumidores valorizaram o sabor, a qualidade, a confiança, valor nutricional, preço, disponibilidade e responsabilidade ambiental, e consideraram menos importantes a embalagem, marca e uso de logo de orgânico, em consumo de iogurte.

4.3 Resultados da escala de atitude

A aplicação de escalas de atitude para prever a aceitação ou preferência de produtos em estudos analise sensorial é relativamente recente e a interpretação dos resultados obtidos é difícil, não havendo estudos publicados que orientem a respeito. Foi realizada a soma dos questionários dos 50 respondentes da cidade de Pirassununga e, dos 170 pontos totais no questionário, verifica-se que a maior parte dos respondentes ficou acima de 100 pontos, conforme dispersão constante na **Figura 26.**

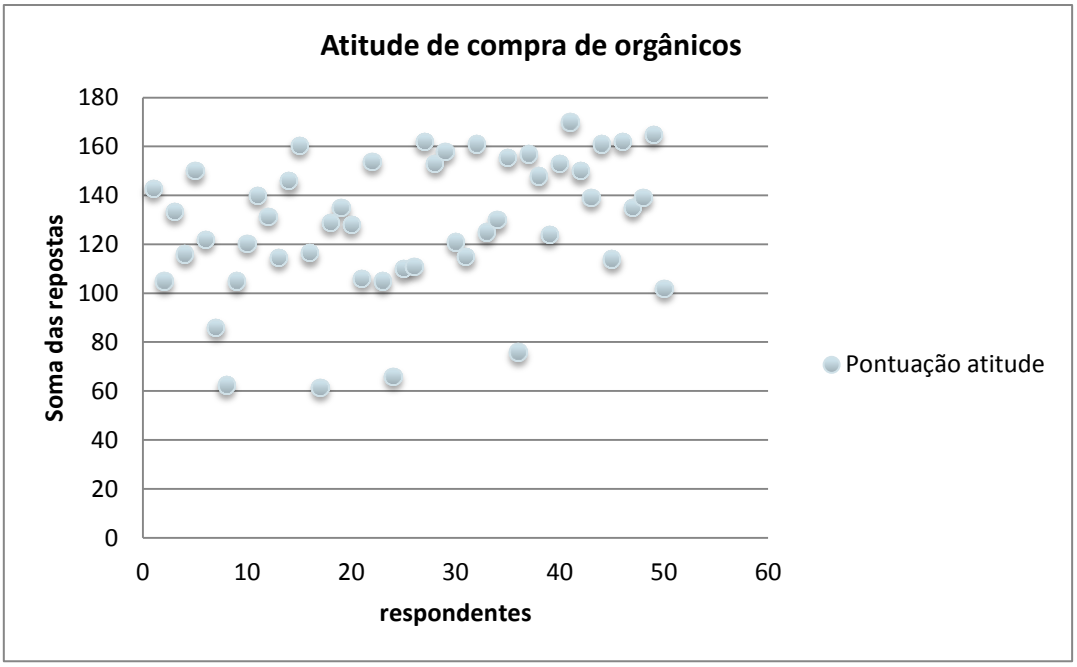


Figura 26. Gráfico com a avaliação da escala de atitude

Observou-se que, apesar do baixo resultado para a importância relativa da presença do selo oficial de produto orgânico, o público apresentou boa atitude sobre orgânicos, pois 56% dos respondentes, moradores da cidade de Pirassununga totalizaram soma total igual ou superior a 128, que significa 75% do total dos pontos possíveis. Tal resultado pode indicar que o desejo de apoiar a produção orgânica e de consumir produtos orgânicos é grande, porém, quando os consumidores se deparam com preços elevados a intenção de comprar é afetada e diminuída, como verificado nos testes anteriores.

4.4 Resultados da associação e palavras

Na tarefa de associação de palavras foi realizada a categorização das palavras associadas a cada tratamento, foi confeccionado um gráfico de barras empilhadas. Somente foram computadas as classes de palavras citadas acima de 5% do total das citações para cada tratamento, conforme **Figura 27**.

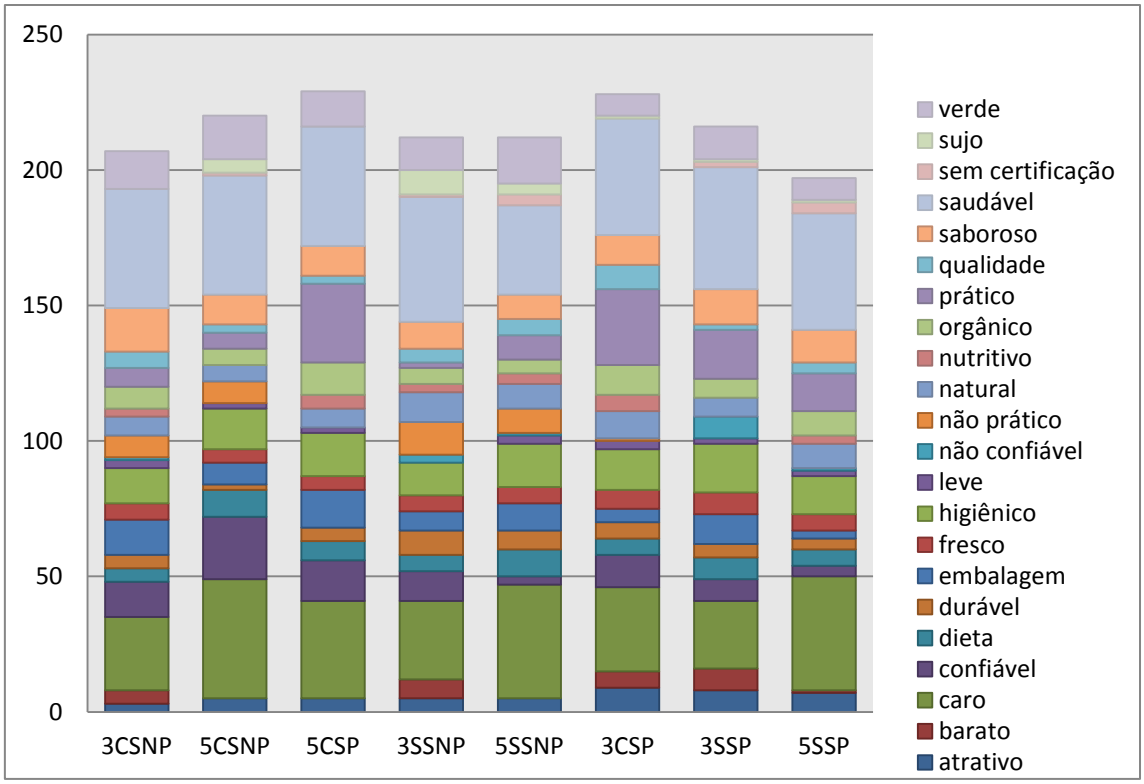


Figura 27. Gráfico contendo as palavras associadas aos tratamentos (Tratamentos estão descritos na Tabela 6).

Para todos os tratamentos, mesmo aqueles sem o selo oficial, os respondentes associaram o produto com as palavras "orgânico" e "saudável", poucos citam o aspecto "sem certificação". A maior classe de palavras citada é "caro", aparecendo em uma frequência um pouco menor mesmo para o produto de menor preço. Para os produtos com selo houve uma maior frequência da palavra "confiável". A mesma palavra foi citada poucas vezes para os produtos mais caros e sem o selo de certificação. Os produtos com a necessidade de lavar para consumir foram menos associados à palavra "prático" e, ao contrário do que poderia ser esperado, a palavra "higiênico" foi associada aproximadamente com a mesma frequência para produtos lavados ou não.

Roininen, Arvola e Lähteenmäki (2006) discutem a utilização de métodos qualitativos como ferramentas adequadas para revelar como os consumidores vêem e percebem novos conceitos, entre eles a

técnica de associação de palavras, comumente aplicada em psicologia. A técnica de associação de palavras se baseia na premissa de que ao oferecer um estímulo aos respondentes e pedir que eles escrevam as associações que vêm às suas mentes obtém-se um acesso irrestrito às representações mentais do estímulo (ARES e DELIZA, 2010b). Além disso, quando se trata de produtos alimentícios as associações que vêm primeiro à mente dos respondentes podem ser as mais relevantes no processo de decisão de compra (ROININEN, ARVOLA e LÄHTEENMÄKi, 2006).

Considerando tais informações, pode–se inferir que ao associar tanto os tratamentos de maior quanto de menor preço à palavra "caro", o consumidor na verdade demonstra que sua referência de valor é o preço da alface in natura, sem nenhum processamento. Ainda, o fato da palavra "higiênico" ser associada a todos os produtos pode indicar que ao ver a alface sendo comercializada em folhas soltas e porcionada em uma embalagem diferenciada o consumidor pode inferir erroneamente que ela se encontra higienizada.

5. Conclusões

O preço foi o fator de maior impacto na decisão de compra de alface orgânica minimamente processada para as duas classes de consumidores, no entanto somente para aqueles que possuem mais conhecimento sobre a produção de orgânicos a presença do selo de certificação foi, também, muito valorizada.

Os consumidores não possuem suficiente informação sobre produtos orgânicos e consequentemente podem não reconhecer adequadamente estes produtos, portanto é necessário prover o consumidor com maior conhecimento sobre a produção de orgânicos e os sistemas de garantia da produção de modo que sua decisão de compra seja consciente.

6. Referências Bibliográficas

ARES, G.; DELIZA, R. Studying the influence of package shape and colour on consumer expectations of milk desserts using word association and conjoint analysis**. Food Quality and Preference,** Kidlington, v. 21, p. 930-937, 2010a.

ARES, G.; DELIZA, R. Identifying important package features of milk desserts using free listing and word association**. Food Quality and Preference,** Kidlington, v. 21, p. 621–628, 2010b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19, Aprova os mecanismos de controle e informação da qualidade orgânica dipostos no anexo I. Brasília, DF, 28 maio 2009.<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_019_de_28-05-2009.pdf> Acesso em:13fev. 2014.

CERDA, A. A.; GARCÍA, L. Y.; ORTEGA-FARÍAS, S.; UBILA, A. M. Consumer preferences and willingness to pay for organic apples. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 39(1), p. 47-59,2012.

DANTAS, M. I. S. et al. Couve minimamente processada: intenção de compra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 762-767, 2005.

DANTAS, M. I. S. **Impacto da embalagem de couve (*Brassica oleracea cv. acephala*) minimamente processada na intenção de compra do consumidor.** 2001. 77 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

DUTCOSKY, S.D. Métodos afetivos ou subjetivos. In: **Análise sensorial de alimentos.** DUTCOSKY, S.D. (Ed). 4ª. Ed. Curitiba: Champagnat, 2013. P 295-355.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção 2.** 2. ed. Seropédica, RJ: Embrapa, 2006.

EMBRAPA. **Perfil do consumidor e do consumo de produtos orgânicos no Rio Grande do Norte**. Aracajú, SE: Embrapa, 2007. Documentos 125, 2007.

FIESP. **Pesquisa Nacional FIESP/IBOPE sobre o perfil do consumo de alimentos no Brasil**. São Paulo: FIESP, 2010. Disponível em: <http://www.abic.com.br/media/EST_PESQFoodTrendsl.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2013.

HOPPE, A. et al. Comportamento do consumidor de produtos orgânicos: uma aplicação da teoria do comportamento planejado. **BASE - Revista de Administração e Contabilidade da Unisinos**, São Leopoldo, v. 9, n. 2, p. 174–188, 2012. doi:10.4013/base.2012.92.06.

LOO, E.J.V.; DIEM, M.N.H.; PIENIAK, Z.; VERBEKE, W. Consumer attitudes, knowledge, and consumption of organic yogurt. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 2118–2129, 2013.

REZENDE, C. L. **A coordenação do sistema agroindustrial do tomate orgânico no estado de São Paulo e o comportamento do consumidor**. 2003. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Programa Inter unidades em Nutrição Humana Aplicada FSP/FCF/FEA, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ROININEN, K.; ARVOLA, A.; LIISA LÄHTEENMÄKI, L. Exploring consumer's perceptions of local food with two different qualitative techniques: laddering and word association. **Food Quality and Preference**, Kidlington, v. 17, p. 20–30, 2006.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira,** Brasília, v. 30, p. 187-194, 2012.

SALMASI, S. V.; MARTINELLI, D. P. Embalagens: relacionando produto, empresa, mercado e a comunicação com o consumidor. In: SEMINÁRIOS EM ADMINISTRAÇÃO FEA/USP, 3., 1998. **Anais...** São Paulo: SEMEADFEA/USP, 1998.12 p.

SILVA, C. H. O.; BASTOS, F. S. Introdução a Conjoint Analysis. In: IX ENCONTRO MINEIRO DE ESTATÍSTICA, 9., 2010. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, MG, 2010. (Minicurso).

SMOLINSKI, R.; GUERREIRO, E.; RAIHER, A. Análise do mercado de produtos orgânicos: estudo de caso de feira em Ponta Grossa, PR. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, n. 23, p. 167-182, jan./jun. 2011. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/made/article/view/20802/14464>. Acesso em: 23 jul. 2011.

SOARES, LLS, DELIZA, R.; GONÇALVES, E. B. Escalas atitudinais utilizadas em estudos de consumidor: tradução e validação para a língua portuguesa. **Alimentos e Nutrição.** Araraquara. *17*(1), 51–64. 2006.

SOARES, L. L. S.; DELIZA, R.; OLIVEIRA, S. P. The Brazilian consumer's understanding and perceptions of organic vegetables: a focus group approach. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 241-246, 2008.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. 215 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

VILLANUEVA, N. D. M.; PETENATE, A. J.; SILVA, M. A. A. P. Comparative performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic. self-adjusting and ranking scales**. Food Quality and Preference,** Kidlington, v. 16, p. 691-703, 2005.

VILLANUEVA, N. D. M.; SILVA, M. A. A. P. Comparative performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps**. Food Quality and Preference,** Kidlington, v. 20, p. 1-12, 2009.

ANEXO 1. Análise de variância dos resultados de intenção de compra de alface orgânica minimamente processada do estudo presencial, considerando-se os fatores socioeconômicos e interações.

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	18352.05	1	18352.05	2100.735	0.000000
Tratamento	401.00	7	57.29	6.557	0.000000
Idade	28.54	2	14.27	1.634	0.196190
Tratamento*Idade	79.88	14	5.71	0.653	0.820149
Erro	4612.61	528	8.74		

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	17884.76	1	17884.76	2068.676	0.000000
Tratamento	424.70	7	60.67	7.018	0.000000
Consumo	295.15	4	73.79	8.535	0.000001
Tratamento*Consumo	57.68	28	2.06	0.238	0.999987
Erro	4495.67	520	8.65		

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	10984.83	1	10984.83	1259.174	0.000000
Renda	145.96	2	72.98	8.366	0.000264
Tratamento	284.03	7	40.58	4.651	0.000045
Renda*Tratamento	26.55	14	1.90	0.217	0.998946
Erro	4675.98	536	8.72		

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	17683.15	1	17683.15	2006.884	0.000000
Tratamento	494.67	7	70.67	8.020	0.000000
Sexo	42.48	1	42.48	4.821	0.028537
Tratamento*Sexo	12.70	7	1.81	0.206	0.984137
Erro	4793.32	544	8.81		

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	6422.662	1	6422.662	727.1660	0.000000
Tratamento	137.959	7	19.708	2.2314	0.030449
Educação	69.259	2	34.630	3.9207	0.020398
Tratamento*Educação	45.037	14	3.217	0.3642	0.983896
Erro	4734.197	536	8.832		

ANEXO 2. Análise de variância dos resultados de intenção de compra de alface orgânica minimamente processada do estudo via internet, considerando-se os fatores socioeconômicos e interações.

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	6226.760	1	6226.760	675.5710	0.000000
Tratamento	678.504	7	96.929	10.5163	0.000000
Idade	1.773	2	0.887	0.0962	0.908308
Tratamento*Idade	255.526	14	18.252	1.9802	0.017784
Erro	4202.967	456	9.217		

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Inteseção	10307.49	1	10307.49	1108.779	0.000000
Tratamento	1120.08	7	160.01	17.212	0.000000
Consumo	231.62	4	57.90	6.229	0.000070
Tratamento*Consumo	138.30	28	4.94	0.531	0.977804
Erro	4090.35	440	9.30		

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	9549.426	1	9549.426	999.0328	0.000000
Tratamento	1019.785	7	145.684	15.2410	0.000000
Renda	58.656	2	29.328	3.0682	0.047467
Tratamento*Renda	42.857	14	3.061	0.3203	0.991435
Erro	4358.754	456	9.559		

Fonte de variação	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Interseção	12101.02	1	12101.02	1294.758	0.000000
Tratamento	1242.16	7	177.45	18.987	0.000000
Sexo	80.68	1	80.68	8.632	0.003467
Tratamento*Sexo	42.97	7	6.14	0.657	0.708693
Erro	4336.62	464	9.35		