



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**ANA LÚCIA ALMEIDA DUARTE**

**ULTRASSOM E COMPOSTOS QUÍMICOS NA SANITIZAÇÃO DE REPOLHO  
ROXO (*Brassica oleracea* var. *Capitata*)**

ALEGRE  
SETEMBRO-2016

ANA LÚCIA ALMEIDA DUARTE

**ULTRASSOM E COMPOSTOS QUÍMICOS NA SANITIZAÇÃO DE REPOLHO  
ROXO (*Brassica oleracea* var. *Capitata*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. DSc. Patrícia Campos Bernardes.  
Coorientadoras: Prof. DSc. Pollyanna Ibrahim Silva  
e Prof. DSc. Raquel Vieira de Carvalho

ALEGRE  
SETEMBRO-2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

D812u Duarte, Ana Lucia Almeida, 1990-  
Ultrassom e compostos químicos na sanitização de repolho roxo  
(*Brassica oleracea* var. *Capitata*) / Ana Lucia Almeida Duarte. – 2016.  
85 f. : il.

Orientador: Patricia Campos Bernardes.

Coorientadora: Pollyanna Ibrahim Silva; Raquel Vieira de Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias.

1. Sanitização. 2. Bactericidas. 3. Hipoclorito de sódio. 4.  
Dicloroisocianurato de sódio. 5. Cloreto de benzalcônio 6. Salmonella. 7.  
Microscopia. I. Bernardes, Patricia Campos. II. Silva, Pollyanna Ibrahim. III.  
Carvalho, Raquel Vieira. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro  
de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 664

---

**ANA LÚCIA ALMEIDA DUARTE**

**ULTRASSOM E COMPOSTOS QUÍMICOS NA SANITIZAÇÃO DE REPOLHO ROXO  
(BRASSICA OLERACEA VAR. CAPITATA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 04 de agosto de 2016.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

*Patricia C. Bernardes*

---

Profa. Dra. Patricia Campos Bernardes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

*Pollyanna*

---

Profa. Dra. Pollyanna Ibrahim Silva  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientadora

*Jackline F. Brilhante de São José*

---

Profa. Dra. Jackline Freitas Brilhante de São José  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinadora

*Joel Camilo Souza Carneiro*

---

Prof. Dr. Joel Camilo Souza Carneiro  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador

A **DEUS** eu AGRADEÇO!

Aos meus pais **Maria Lúcia** e **Evandro** e aos meus irmãos **Lívia, Fábio** e **Rafael** eu dedico e agradeço por todo amor, confiança e lealdade.

*“DEUS não escolhe os capacitados, ele capacita os escolhidos.”*  
*André Ortis*

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é a Deus. A força que trazemos conosco nesta trajetória é gerada e conservada pelo poder Divino. Somente na presença Dele conseguimos ser capazes de driblar todos os obstáculos e de nos tornar muralhas diante das situações mais difíceis.

Agradeço aos meus pais Maria Lúcia e Evandro por doarem a vida para me verem crescer pessoalmente e profissionalmente. Desde que um filho nasce os pais iniciam uma trajetória de plantio de bons valores para colherem os frutos ao longo da vida desse filho. Assim vocês fizeram por mim!

Aos meus irmãos Lívia, Fábio e Rafael eu agradeço por todo amor, carinho e zelo por mim. Por serem meus alicerces, são vocês que me completam e que dão o toque final na educação que recebo dos nossos pais.

Ao meu avô Manoel, que apesar de hoje não fazer mais parte deste plano espiritual, enquanto esteve por aqui, foi o meu maior incentivador. Vovô, essa é prá você!

Obrigada, Aline Mascarenhas por estar comigo desde o primeiro dia de Alegre, por toda a ajuda com o experimento, por ser meu ombro, braço, perna, corpo, mente amiga. Você faz parte de mim!

Às amigadas construídas em Alegre ao longo desses seis anos. Lud, pela companhia e pelas sagas atrás de repolho roxo em pleno domingo! Marilza, Neia, Marcílio, Lier, Gracci, Wertinho, o meu muito obrigada. Vocês foram minha válvula de escape, minha família, meus irmãos!

Aos meus amigos de Minas Gerais, em especial à Becca, por suportarem a distância, me darem força para estar aqui e ânimo para retornar. Mesmo longe, vocês estiveram comigo a todo momento.

Aos meus companheiros de laboratório e pesquisa, Syllas e Hygor, devo agradecer imensamente! Muito obrigada por me suportarem, por toda paciência, pelo auxílio, por serem fortes e se manterem equilibrados mesmo depois de algumas 14 horas seguidas de experimento.

Ao Denes pela amizade e companheirismo nas pesquisas desde a Iniciação Científica até o Mestrado.

À minha orientadora Patricia Bernardes que vem depositando confiança em mim desde 2013, me auxiliando e contribuindo para meu crescimento intelectual e pessoal. Ganhei uma amiga nesses anos!

Às minhas coorientadoras Pollyanna e Raquel por toda ajuda.

Ao professor Joel por toda paciência em me ajudar na estatística e por aceitar o convite para a Banca.

A todos os membros presentes nesta banca. Joel, Pollyanna, Jackline, muito obrigada!

A todos os funcionários da UFES, em especial às técnicas Letícia, Amanda e Natália, por todo auxílio e convivência!

Por fim, à cidade de Alegre - ES por ter me acolhido nestes 6 anos. Fiz daqui a minha morada, não me senti de passagem, me senti cidadã! Levarei comigo para sempre cada canto, cada historia aqui vivida. MUITO OBRIGADA!

## **BIOGRAFIA**

ANA LÚCIA ALMEIDA DUARTE, filha de Evandro Manoel Duarte de Campos e Maria Lúcia Almeida Duarte, brasileira, nasceu em Lagoa Santa - Minas Gerais, no dia 12 de abril de 1990.

Em 2010 iniciou o curso de Nutrição no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, concluindo a graduação e colando grau em agosto de 2014.

Em agosto de 2014, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Espírito Santo.

Submeteu-se à defesa de dissertação em agosto de 2016.

## RESUMO

DUARTE, Ana Lúcia Almeida. **Ultrassom e compostos químicos na sanitização de repolho roxo (*Brassica oleracea* var. *Capitata*)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre / ES. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. DSc. Patrícia Campos Bernardes. Coorientadoras: Prof<sup>a</sup>. DSc. Pollyanna Ibrahim Silva e Prof<sup>a</sup>. DSc. Raquel Vieira de Carvalho.

A indústria de alimentos enfrenta, devido ao aumento da demanda por alimentos prontos para consumo, um grande desafio. O consumidor exige produtos de rápido preparo, nutritivos, com características próximas ao *in natura* e seguros do ponto de vista microbiológico. O repolho roxo é considerado a brassicácea mais consumida no Brasil. Possui compostos antioxidantes como antocianinas e frequentemente é consumido cru. A etapa de sanitização dos alimentos é de grande importância para garantir a segurança dos alimentos consumidos crus. Assim, existe o interesse por compostos e tratamentos que possam propiciar qualidade microbiológica e segurança a esses alimentos, sem alterar suas características físico-químicas, nutricionais e sensoriais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar efeito isolado e combinado do uso de compostos clorados (hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato de sódio), surfactante (cloreto de benzalcônio) e ultrassom (40 kHz) na sanitização de repolhos roxos e o impacto desses tratamentos nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, logo após a sanitização e durante o tempo de armazenamento de até 7 dias a  $8 \pm 1$  °C. Foram realizadas análises de bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos e leveduras, bactérias lácticas, coliformes totais, *E. coli*, acidez total titulável, pH, teor de sólidos solúveis totais, cor, antocianinas, perda de massa, e inativação/remoção de *Salmonella enterica* Typhimurium intencionalmente aderidas ao repolho roxo. Foi realizada também análise sensorial dos repolhos roxos tratados com dicloroisocianurato de sódio combinado ou não ao ultrassom e controle (somente tratado com água). Os resultados foram avaliados por ANOVA, análise de regressão ou teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Genes. Após a aplicação dos tratamentos no repolho roxo, a contagem de bactérias mesófilas aeróbias foi reduzida entre 0,33 a 2,52 log de UFC.g<sup>-1</sup>, coliformes totais entre 0,26 e 1,90 de log de UFC.g<sup>-1</sup>, bactérias lácticas entre 0,01 a 3,23 de UFC.g<sup>-1</sup>, fungos e leveduras entre 0,10 a 0,66 log de UFC.g<sup>-1</sup>. O surfactante cloreto de benzalcônio associado ou não ao ultrassom apresentou os melhores resultados na redução dos grupos bacterianos. Porém, este sanitizante foi o que

mais prejudicou e impossibilitou a manutenção das características físico-químicas das amostras de repolho roxo. As reduções ocasionadas pelo tratamento com ultrassom foram estatisticamente iguais às encontradas pelos compostos clorados, na redução da microbiota presente no repolho, exceto para bactérias lácticas. O ultrassom combinado ao dicloroisocianurato de sódio aumentou em 1 ciclo log a remoção de células de *Salmonella* aderidas ao repolho roxo em comparação ao dicloroisocianurato de sódio utilizado isoladamente. Em relação à análise sensorial, não foram detectadas diferenças de cor e textura entre os tratamentos utilizando dicloroisocianurato de sódio isoladamente e combinado ao ultrassom quando comparados à amostra controle no teste sensorial de comparação múltipla. As amostras apresentaram boa aceitação global uma vez que os avaliadores não detectaram diferenças de aceitação entre os tratamentos e a amostra controle ( $p > 0,05$ ). O presente estudo mostrou a capacidade do ultrassom em substituir compostos clorados na redução da microbiota do repolho roxo e sua eficiência na remoção/inativação de células de *Salmonella* Typhimurium intencionalmente aderidas à superfície do repolho quando combinados a estes compostos.

**Palavras-chaves:** sanitização, bactericidas, compostos clorados, surfactante, microscopia, *Salmonella* Typhimurium, adesão bacteriana.

## ABSTRACT

DUARTE, Ana Lucia Almeida. **Ultrasound and chemicals compounds on purple cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) sanitization**. 2016. Dissertation (MSc in Food Science and Technology) – Federal University of Espirito Santo, Alegre/ES . Advisor: Prof. DSc. Patrícia Campos Bernardes. Co-advisors: Prof<sup>a</sup>. DSc. Pollyanna Ibrahim Silva and Prof<sup>a</sup>. DSc. Raquel Vieira de Carvalho

Food industry has a high challenge due to increased demand for ready to eat food. Consumer demands food of fast preparation, nutritious, with similar characteristics to natural and safe from a microbiological point of view. Purple cabbage is the most consumed Brassicacea in Brazil. It has antioxidant compounds as anthocyanins and is often eaten raw. The step of sanitization of food is very important to ensure safety of raw food. So, there is interest in compounds and treatments that can provide microbiological quality and safety to food without change their physicochemical characteristics, nutritional and sensory. The objective of the present study was to evaluate the single and combined effect of using chlorinated compounds (sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate), surfactant (benzalkonium chloride) and ultrasound (40kHz) on sanitization of purple cabbages and the impact of these treatments in microbiological, physical-chemical and sensory characteristics after sanitization and during storage for 7 days at  $8 \pm 1$  °C. Were performed analyzes of aerobic mesophilic bacteria, filamentous fungi and yeasts, lactic acid bacteria, coliforms 35 °C; *E. coli*, total acidity, pH, total soluble solids, color, anthocyanins, mass loss, and inactivation/removal of *Salmonella enterica* Typhimurium intentionally adhered to the purple cabbage. It was also carried out sensory analysis of purple cabbages treated with sodium dichloroisocyanurate combined or not with ultrasound and control (treated only with water). Results were assessed by ANOVA, regression analysis or Duncan's test with level of probability of 5%. Statistical analyzes were performed using software Genes®. After applying the treatments to purple cabbage, the mesophilic aerobic bacteria count was reduced from 0.33 to 2.52 log cfu.g<sup>-1</sup>, total coliforms between 0.26 and 1.90 log cfu.g<sup>-1</sup>, lactic acid bacteria between from 0.01 to 3.23 cfu.g<sup>-1</sup> and fungi and yeasts from 0.10 to 0.66 log cfu.g<sup>-1</sup>. Benzalkonium chloride combined or not ultrasound showed better results for reducing bacterial groups. However, this sanitizing was the most damaged and impossible to maintain the

physico-chemical characteristics of purple cabbage samples. The reductions caused by treatment with ultrasound were statistically similar to those found to chlorine compounds, in the reduction of microorganisms present in cabbage, except for lactic acid bacteria. Ultrasound combined with sodium dichloroisocyanurate increased by 1 log cycle removal of *Salmonella* cells adhered to purple cabbage compared to sodium dichloroisocyanurate used alone. Regarding sensory analysis, color and texture differences were not detected between treatments using sodium dichloroisocyanurate alone and combined with ultrasound when compared to the control sample in the sensory test multiple comparison. The samples showed good overall acceptance since the consumers did not detect any difference between treatments and control sample ( $p > 0.05$ ). This study showed the ultrasound's ability to replace chlorinated compounds in reducing microbiota of purple cabbage and its efficiency in the removal/inactivation of *Salmonella* Typhimurium cells intentionally adhered to the cabbage surface when combined with these compounds.

**Keywords:** sanitization, bactericides, chlorinated compounds, surfactant, microscopy, *Salmonella Typhimurium*, bacterial adhesion.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Procedimentos de sanitização testados no repolho roxo .....	33
Tabela 2 - Valores de pH nas soluções utilizadas nos procedimentos de sanitização do repolho roxo anteriormente ao processo de sanitização .....	34
Tabela 3 - Resumo da Análise de Variância (ANOVA) da contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes totais, bactérias lácticas e fungos filamentos e leveduras em repolhos roxos armazenados por 7 dias a $8 \pm 1$ °C. ....	35
Tabela 4 - Médias das contagens da microbiota do repolho roxo em log UFC.g <sup>-1</sup> após a aplicação dos procedimentos de sanitização. ....	36
Tabela 5 - Resumo da análise de variância (ANOVA) dos resultados de antocianinas, acidez titulável, pH, SST e perda de massa, nas amostras de repolho roxo, submetidas aos sanitizantes armazenados à $8 \pm 1$ °C por 7 dias. ....	44
Tabela 6 - Médias das concentrações de antocianinas em mg de cianidina-3-glicosídeo/100 g e médias das porcentagens de perda de antocianinas comparadas ao controle (sem sanitizar) das amostras de repolho submetidos aos procedimentos de sanitização e armazenamento por 7 dias a $8 \pm 1$ °C. ....	45
Tabela 7 - Valores das médias da acidez titulável e pH nas amostras de repolho roxo armazenados durante 7 dias a $8 \pm 1$ °C. ....	47
Tabela 8 - Resumo da análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de cor L*, a*, b*, c, h°, nas amostras de repolho roxo, submetidas aos procedimentos de sanitização e armazenadas a $8 \pm 1$ °C por 7 dias. ....	50
Tabela 9 - Médias dos valores dos parâmetros de cor L, a*, b*, c* e h° referentes a cada procedimento de sanitização durante o período de armazenamento de 7 dias a $8 \pm 1$ °C. ....	52
Tabela 10- Valores médios da contagem de <i>S. Typhimurium</i> aderidas em repolho roxo e redução decimal após os tratamentos.....	57
Tabela 11 - Valores médios e desvio-padrão da contagem de <i>S. Typhimurium</i> e de URL nas soluções após os tratamentos por 5 minutos. ....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reduções decimais em log de UFC.g <sup>-1</sup> , das contagens de bactérias mesófilas aeróbias nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização. ....	37
Figura 2- Comportamento da população de bactérias mesófilas aeróbias em log UFC.g <sup>-1</sup> de repolho roxo durante o armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C.....	39
Figura 3- Reduções decimais em log de UFC.g <sup>-1</sup> , das contagens de coliformes totais nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização.....	41
Figura 4 - Reduções decimais em log de UFC.g <sup>-1</sup> , das contagens de bactérias lácticas nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização.....	42
Figura 5 - Reduções decimais em log de UFC.g <sup>-1</sup> , das contagens de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização. ....	43
Figura 6- Comportamento de antocianinas nas amostras de repolho roxo em função do tempo de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C. ....	46
Figura 7- Perda de massa das amostras de repolho roxo em função do tempo de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C. ....	47
Figura 8- Comportamento do pH das amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C. ....	48
Figura 9 - Comportamento do parâmetro de cor c* nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C.....	53
Figura 10: Comportamento da concentração de SST nas amostras de repolho roxo em função do tempo de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C.....	55
Figura 11 - Fotomicrografia Eletrônica dos cortes de repolho roxo e seus respectivos tratamentos: sem sanitizar (controle), água, dicloroisocianurato de sódio (DC) e dicloroisocianurato de sódio combinado ao ultrassom (DC+US). ....	59

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1	Repolho Roxo	15
2.2	Sanitizantes	18
2.3	Compostos Clorados	19
2.4	Surfactantes	21
2.5	Ultrassom	21
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1	Aplicação dos tratamentos	25
3.2	Avaliação do pH das soluções	25
3.3	Avaliação da microbiota do repolho roxo	26
3.3.1	Contagem de bactérias mesófilas aeróbias	26
3.3.2	Contagem de coliformes totais e <i>E.coli</i>	26
3.3.3	Contagem de bactérias lácticas	27
3.3.4	Contagem de fungos filamentosos e leveduras	27
3.4	Avaliação da remoção/inativação de <i>Salmonella</i>	27
3.4.1	Avaliação da eficiência na inativação/remoção de células de <i>Salmonella</i> intencionalmente adicionadas à superfície do repolho roxo	27
3.4.2	Preparo das amostras	27
3.4.3	Preparo do inóculo	28
3.4.4	Inoculação das amostras de repolho roxo	28
3.4.5	Quantificação das células de <i>Salmonella</i> aderidas ao repolho	28
3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	29
3.6	Análises físico-químicas do repolho roxo	30
3.6.1	Acidez titulável	30
3.6.2	pH	30
3.6.3	Teor de sólidos solúveis	30
3.6.4	Perda de Massa	30
3.6.5	Cor	31
3.6.6	Determinação do teor de antocianinas	31
3.7	Análise sensorial do repolho roxo	31
3.7.1	Teste de diferença de comparação múltipla	32
3.7.2	Teste de aceitação	32
3.9	Planejamento Experimental e Análise Estatística dos Dados	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
4.1	pH das soluções sanitizantes	34
4.2	Microbiota do repolho roxo no período de armazenamento	35

4.3	Efeito dos sanitizantes sobre as características físico-químicas do repolho...	43
4.4	Efeito do dicloroisocianurato de sódio isolado e combinado ao ultrassom sobre a remoção de células de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium aderidas em superfície de repolho roxo. ....	56
4.5	Efeito da sanitização sobre as características sensoriais das amostras de repolho roxo .....	62
<b>5</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>79</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O repolho (*Brassica oleracea var. capitata*) é uma hortaliça considerada de grande importância econômica, sendo a brassicácea mais consumida no Brasil. Seu destaque é dado por possuir, em sua composição, um componente de alto valor nutricional denominado antocianina. As antocianinas são pigmentos que conferem cor e proteção ao repolho roxo, além de atuarem como antioxidantes agregando valor nutricional à hortaliça.

Segundo a Embrapa (2016), o repolho pode ser comercializado tanto na sua forma original (unidade) quanto na forma picada e embalada. Porém é fundamental a exposição destes produtos em gôndolas refrigeradas, garantindo assim a sua conservação.

A qualidade microbiológica de frutas e hortaliças prontas para consumo está diretamente relacionada à presença de microrganismos deterioradores, que provocam alterações nas características sensoriais do produto e também, a microrganismos patogênicos que podem causar danos à saúde do consumidor (RICO et al., 2007). Devido à forma de seu cultivo, colheita, manipulação pós-colheita, processamento e distribuição, as frutas e hortaliças possuem normalmente ampla carga microbiana, podendo haver, até mesmo, contaminação por microrganismos patogênicos.

Alguns microrganismos patogênicos, como *Salmonella*, possuem capacidade de aderir à superfície de frutas e hortaliças. Esta capacidade torna mais difícil sua remoção e traz a necessidade do desenvolvimento de novos estudos e de novas estratégias que consigam garantir a segurança microbiológica do produto (SÃO JOSÉ, 2013).

Somente a etapa de lavagem em água corrente já elimina boa parte da carga microbiana aderida à superfície dos vegetais, porém se torna essencial o uso de sanitizantes para uma higienização segura, inativação e eliminação dos patógenos.

O cloro é o sanitizante de maior utilização pelas indústrias de alimentos, devido ao seu baixo custo, facilidade de uso, atividade antimicrobiana e dissolução em água. Porém, alguns países vêm proibindo o seu uso. Esta proibição está associada à formação de subprodutos tóxicos pela combinação da matéria orgânica

com compostos clorados inorgânicos. Este fato torna ainda mais importante o estudo de novas técnicas de sanitização.

Alguns estudos vêm demonstrando que o ultrassom pode auxiliar na sanitização de frutas e hortaliças. O ultrassom de alta intensidade e baixa frequência de 20 a 1000 kHz pode atuar inativando microrganismos pelo processo de cavitação ou facilitando a inativação pelos sanitizantes devido à desagregação das células.

Levando em consideração a necessidade de estudos sobre a efetividade de novas técnicas de sanitização, torna-se relevante o estudo de novos métodos de sanitização e sua influência sobre a qualidade microbiológica, características físico-químicas e sensoriais do repolho roxo.

Como objetivo, este trabalho avaliou a ação de compostos clorados e surfactante, associados ou não ao ultrassom, na qualidade microbiológica, físico-química, nutricional e sensorial de repolhos roxos processados e prontos para consumo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Repolho Roxo

Dentre as hortaliças, o repolho (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) é caracterizado por ser formado por inúmeras folhas, que, sobrepostas, dão origem a uma “cabeça”, que constitui a parte comestível da planta. Sua classificação comercial é dada segundo a sua forma (achatada e pontuda) e a cor da cabeça (verde ou branca e roxa) (TIVELLI e PURQUEIRO, 2010). O repolho, assim como a couve, o brócolis, a couve-flor, a couve-chinesa e o rabanete, pertence à família das Brassicaceae (EMBRAPA, 2015).

Mundialmente, o repolho, é considerado uma hortaliça de grande importância econômica, e do grupo das brassicáceas é a mais consumida (SOARES, 2009).

No Brasil, pequenas áreas do sul e sudeste dominam a produção de repolho. (EMBRAPA, 2016). Em 2015 no estado do Espírito Santo, foram transferidos pela central de abastecimento da Grande Vitória, 17.334.070 kg de repolho com o preço médio de R\$ 0,59, o que gerou uma receita de R\$ 10.140.430,95 para o estado (CEASA, 2016).

O repolho roxo destaca-se como fonte de vitamina C e fornece vitaminas B1, B2, E e K, além de sais minerais sobretudo cálcio e fósforo. Destaca-se também, por possuir em sua composição, flavonoides como a antocianina. É uma hortaliça legítima na produção da substância antocianina (LOPES, et al., 2006). As antocianinas têm poder de atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, além de conferir proteção a processos oxidativos em diversos tecidos das plantas, principalmente em fases iniciais do crescimento (EIBOND et al. 2004).

Apesar de existirem muitas plantas que contêm em sua composição antocianina, são poucas as que atuam como fonte comercial desse composto (MALACRIDA e MOTTA, 2006). O repolho roxo apresenta grande vantagem comercial, pois é fonte de antioxidante e possui baixo valor de mercado (LOPES et al., 2006).

Observa-se, atualmente, um grande interesse por antocianinas em diversos segmentos de mercado, com destaque para as indústrias de alimentos, farmacêutica

e cosmética, onde podem ser aplicadas, por exemplo, como corantes, principalmente corantes vermelhos (FAVARO, 2007).

Além do potencial de coloração das antocianinas, o interesse na utilização deste composto tem se tornado cada vez mais relevante devido a seus benefícios à saúde (EIBOND et al. 2004).

O seu potencial antioxidante está ligado ao fato de atuar combatendo radicais livres no organismo, protegendo moléculas como o ácido desoxirribonucleico (DNA), evitando assim processos carcinogênicos (SILVA et al., 2010) e outras doenças crônicas como mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares (REYNERTSON et al., 2006).

Segundo algumas pesquisas, as antocianinas mantêm sua integridade ao passar do trato digestivo para a circulação sanguínea. Estudos realizados em humanos apontaram que as antocianinas aparecem no plasma sanguíneo, em níveis farmacologicamente ativos, depois de uma alimentação rica em frutas e legumes (EIBOND et al., 2004; CAO et al., 1998).

## 2.2 Doenças Veiculadas por Alimentos

É considerável, nos últimos tempos, o aumento das doenças veiculadas por alimentos. Uma variedade de fatores contribuem para esse aumento. A adaptação a novos estilos de vida da população implica diretamente em sua rotina alimentar, aumentando a ingestão de alimentos já prontos para o consumo, criando uma tendência para o consumo de alimentos crus, processados e prontos para o consumo. Além disso, observa-se um aumento na população de grupos mais susceptíveis, formados principalmente por idosos e indivíduos imunodeprimidos (LANDGRAF, 2002).

No cultivo tradicional de hortaliças, durante o seu desenvolvimento, estas se mantem em contato com o solo. O solo propicia um ambiente úmido que, associado a adubos orgânicos eleva a probabilidade de contaminações. Além disso, a maioria das práticas agrícolas utilizam águas de irrigação não tratadas, provenientes de rios, córregos e lagos adjacentes às hortas, os quais propiciam aumento no risco de contaminação (ROSA e MARTINS, 2001).

Segundo o Ministério da saúde, entre os anos de 2000 e 2015, no Brasil, foram registrados 10.666 surtos, 209.240 pessoas ficaram doentes e 155 morreram em consequência de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's). O Sudeste foi a

região com mais notificações de surtos neste período (42%). O local com maior ocorrência de surtos foi em residências com 38,5% dos casos, os restaurantes/padarias ficaram em segundo lugar registrando 15,5% (BRASIL, 2016). Além de causar prejuízos à saúde, essas doenças promovem gastos consideráveis para os governos. Cada vez mais torna-se preocupante o impacto econômico que as DVA's podem trazer para o país gerando grandes perdas para as indústrias, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000).

O consumo de frutas e vegetais *in natura*, quando não seguem padrões de higienização adequados, torna-se fator de risco para infecção por patógenos entéricos. Recentemente, em surtos relacionados com produtos *in natura*, foram relatados casos envolvendo *Escherichia coli* O157:H7 em espinafre e alface; e *Salmonella* Typhimurium em tomates e alface. Espécies de *Salmonella*, quando infectam o homem, são responsáveis por diversas respostas como febre tifoide, paratifoide e gastroenterites agudas e severas, sendo assim, a presença de qualquer tipo de *Salmonella* não é tolerada em produtos alimentícios (HEATON e JONES, 2007).

Os patógenos mais envolvidos nos surtos são: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, alguns tipos de vírus e protozoários (ABADIAS et al., 2008; HEATON e JONES, 2008; CDC, 2012; CDC, 2014; CDC, 2015d). Nos Estados Unidos, uma a cada seis pessoas são vítimas de doenças veiculadas por alimentos anualmente, e *Salmonella* é a bactéria mais causadora (CDC, 2015c).

No Brasil, *Salmonella* apresenta-se como o patógeno mais envolvido em surtos alimentares (BRASIL, 2016). *Salmonella* são bastonetes gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. Tem capacidade de multiplicar-se entre pH 3,8 e 9,5, sendo o pH ótimo entre 7,0 e 7,5. Multiplica-se entre as temperaturas de 5 e 46 °C, e a sua temperatura ótima se encontra entre as faixas de 35 a 43 °C (JAY, 2005).

Predominam entre as fontes de contaminação de *Salmonella*, alimentos de origem animal, como carne de aves, ovos e produtos lácteos (ABULREESH, 2012). Porém, diversos surtos foram registrados envolvendo consumo de frutas e vegetais crus (FDA, 2014).

Patógenos como *Salmonella* podem manter-se ativos por dias na superfície de frutas e hortaliças, sobrevivência esta que varia com o tipo de microrganismo e a sua localização no tecido vegetal (BARTZ et al., 2015).

Estruturas de aberturas como estômatos, hidatódios, lenticelas e injúrias presentes na superfície dos vegetais podem facilitar o transporte de patógenos para regiões internas de frutas e hortaliças, por meio da água externa ou por locomoção independente, colonizando essas regiões, onde os tornam protegidos de fatores ambientais e ação de sanitizantes (OLAIMAT e HOLLEY, 2012; FDA, 2014; BARTZ et al., 2015).

Sabe-se que o biofilme bacteriano é uma forma de manter os microrganismos protegidos na superfície do alimento. Morris e Monier (2003) afirmam que são decorrentes de biofilmes entre 30% e 80% da população total de bactérias presentes na superfície de uma hortaliça. Os biofilmes constituem um arranjo de microrganismos em uma matriz exopolissacarídica associada a superfícies de forma irreversível, e esta condição dificulta o efeito sanitizante de compostos químicos (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; ANDRADE, 2008).

## **2.2 Sanitizantes**

Na manipulação de hortaliças, somente a etapa lavagem em água corrente de boa qualidade já alcança uma redução de até 90% da carga microbiana presente. Mas essa redução não é suficiente para atingir níveis seguros de contaminação, sendo necessária utilização de sanitizantes (FRANK e TAKEUSHI, 1999).

Sendo assim, a etapa de lavagem seguida de sanitização se faz de grande importância. Nesta fase é possível eliminar e inativar grande parte da microbiota presente, resultando em um produto de qualidade higiênico-sanitária satisfatória, tornando-o seguro para o consumo (ARTÉS e ALLENDE, 2005; RUÍZ-CRUZ et al., 2007; ALLENDE et al., 2008b; RAHMAN et al., 2011). Porém é de grande importância levar em consideração no momento da escolha do sanitizante, aquele sanitizante que além da qualidade microbiológica assegure também a sua qualidade sensorial e nutritiva.

O Mercosul, em seu regulamento técnico, define que, produtos com ação antimicrobiana/sanitizante são agentes ou produtos que reduzem significativamente o número de bactérias a níveis seguros, de acordo com as normas de saúde (MERCOSUL/GMC, 2002).

A maioria dos sanitizantes utilizados na indústria de alimentos em produtos frescos, prontos para consumo é a base de compostos clorados (ANTONIOLLI et al., 2005; ALVARO et al., 2009; NASCIMENTO e SILVA, 2010; CHEN e ZHU, 2011; CHEN et al., 2013).

Segundo Andrade (2008), a escolha do sanitizante deve ser baseada em se o produto é aprovado por órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura, se apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana, se é capaz de destruir rapidamente os microrganismos e se o produto é estável sob variadas condições de uso, possuindo também baixa toxicidade.

### **2.3 Compostos Clorados**

Classificam-se os compostos clorados em: orgânicos e inorgânicos. O cloro gás ( $\text{Cl}_2$ ), o hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ), o hipoclorito de cálcio ( $\text{CaClO}_2$ ) e o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) são compostos inorgânicos. A formação dos compostos clorados orgânicos é dada pela reação do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e imidas. Compostos clorados orgânicos possuem vantagens em relação aos inorgânicos por não reagirem com a matéria orgânica e formarem menos trihalometanos. Além disso, liberam mais lentamente o ácido hipocloroso, tornando-se mais efetivos por períodos de tempo maiores, sendo mais estáveis (ANDRADE, 2008).

Por serem de fácil manuseio, pouco onerosos, possuírem ampla atividade microbiana e dissolução completa em água, os compostos clorados se tornam os produtos mais utilizados como sanitizantes na indústria de frutas e hortaliças (ALLENDE et al., 2008a; SELMA et al., 2008; NASCIMENTO e SILVA, 2010; SHEN et al., 2012).

Segundo Andrade (2008), o seu uso nas indústrias, além do baixo custo, se dá principalmente por serem efetivos na eliminação de fungos filamentosos e leveduras e de bactérias gram-positivas e negativas. Além disso, dependendo do pH da solução, esses compostos sanitizantes apresentam ação também sobre esporos bacterianos, os quais consistem de um grupo microbiano muito importante em processamento de alimentos.

O potencial antimicrobiano dos compostos clorados, com exceção ao dióxido de cloro, é associado à liberação do ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) em solução aquosa. Essa forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a forma

dissociada (ANDRADE, 2008). O ácido hipocloroso é resultado da hidrólise da substância clorada e tem ação contra diferentes microrganismos (PARISH et al., 2003). O pH é fator importante para a liberação e ação do ácido hipocloroso, quanto menor o pH da solução, maior é a concentração do HClO. Isso torna os compostos clorados mais ativos em pH baixos (ANDRADE, 2008). O principal efeito provocado pelo ácido hipocloroso nas células dos microrganismos é a atividade oxidativa. O HClO libera oxigênio, o qual reage com os componentes do protoplasma celular. O cloro em si pode atuar também se unindo às proteínas de membrana celular e interferindo no metabolismo microbiano, principalmente na inibição de enzimas da via glicolítica (VEIGA, 2003).

Algumas preocupações são relevantes ao utilizar o cloro. O cloro é uma substância corrosiva, podendo provocar irritações na pele e no trato respiratório (ALVARO et al., 2009). Pode ocorrer também hipercloração da água residual, formando trihalometanos e outros subprodutos (RYAN-BARRY et al., 2008; RUÍZ-CRUZ et al., 2007; RICO et al., 2007; SELMA et al., 2008; RAHMAN et al., 2011) considerados carcinogênicos. Os compostos clorados vêm se tornando destaques de preocupação ambiental e alguns grupos ambientalistas sugerem a proibição do uso desse produto em todo o mundo (NASCIMENTO et al., 2008; RICO et al., 2007; ÖLMEZ e KRETZSCHMAR, 2009; TORNUK et al., 2011; RAHMAN et al., 2011). A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classifica os trihalometanos como cancerígenos. Países europeus como a Alemanha, restringem um limite de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  de trihalometanos na água (MACÊDO et al., 2001; PAVÓN et al., 2008). No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde de nº2914 de 14 de dezembro de 2011, que estabelece normas para a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, limita a concentração máxima de trihalometanos totais em água em  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  (BRASIL, 2011).

A eficiência destes compostos vem sendo questionada. Essa atribuição se dá à dificuldade dos componentes ativos da solução de tratamento alcançar os sítios de colonização das células microbianas, e pela capacidade destas células de se alojarem em fissuras e espaços intercelulares. Outro fator importante é que esses microrganismos são capazes de formar biofilmes em tecido vegetal, em equipamentos e utensílios de contato com o alimento, tornando-se mais resistentes ao uso destes compostos (MORETTI, 2008; SANGO et al., 2014).

Novas alternativas vêm surgindo no objetivo de potencializar remoção/inativação na sanitização, assegurando a conservação de alimentos, mantendo o seu valor nutricional e suas características sensoriais. Essas alternativas trazem consigo baixo consumo de energia, a custo competitivo, respeito pelo ambiente e alto grau de segurança (CHEMAT et al., 2011).

## **2.4 Surfactantes**

Surfactantes são moléculas com propriedades tensoativas por apresentarem em sua estrutura grupos polares (hidrofílicos) e apolares (hidrofóbicos). Classificam-se os surfactantes de acordo com a estrutura química e a carga dos grupos polares. Os surfactantes podem ser não-iônicos, aniônicos, catiônicos e anfóteros. O tensoativo não iônico não libera carga em solução aquosa, os demais liberam um ânion (aniônicos) e um cátion (catiônicos) (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; ANDRADE, 2008; RIZZATTI e ZANETTE, 2009; ZERDAS 2009, CHABBA et al., 2015).

A água, utilizada isoladamente, não apresenta boa molhabilidade por apresentar alta tensão superficial, equivalente a  $72 \text{ mJ.m}^{-2}$ . Deve-se reduzir essa tensão para aproximadamente  $36 \text{ mJ.m}^{-2}$ , otimizando assim, o contato entre o surfactante e o resíduo a ser removido (WOODS, 2004, ANDRADE, 2008). Essa redução torna-se possível com o uso tensoativos. Os surfactantes agem em superfícies provocando o rompimento das interações das superfícies com os microrganismos removendo os patógenos mais rapidamente (RAIDEN, 2002).

Entre os surfactantes catiônicos, temos os compostos quaternários de amônio (QAT's). O cloreto de benzalcônio (CB) é denominado uma amônia quaternária e além da sua ação surfactante de diminuir a tensão superficial de soluções aquosas e permitir melhor contato da solução com resíduos e microrganismos, este composto vem sendo utilizado pela indústria como agente antimicrobiano por provocar desnaturação proteica, alteração da permeabilidade da parede celular do microrganismo e redução da entrada normal de nutrientes na célula (MACHADO, 2005).

## **2.5 Ultrassom**

O ultrassom tem sido considerado um método alternativo de sanitização. Essa tecnologia vem ganhando espaço na indústria de alimentos. Utiliza-se o ultrassom

de baixa potência para avaliação das propriedades físico-químicas de alimentos e produtos alimentares como a composição e estrutura, e outras avaliações de controle de qualidade (DEMIRDÖVEN e BAYSAL 2008; AWAD et al., 2012). Já o ultrassom de alta potência vem sendo aplicado na inativação de microrganismos em processos de sanitização, inativação de enzimas, em processos de cristalização, emulsificação, secagem e processos de congelamento (ARZENI et al., 2012; SANGO et al., 2014).

Para utilizar-se das ondas ultrassônicas faz-se necessária uma fase líquida. Por isso são encontrados ultrassons de banhos ou sondas ultrassônicas de imersão (AWAD et al. 2012; SANGO et al., 2014)

As ondas ultrassônicas são ondas mecânicas com capacidade de propagar-se em meios materiais com frequência maior que 16 kHz. O espectro acústico é subdividido em três regiões principais: faixa dos infrassons (inferior a 16 Hz), faixa dos sons (entre 16 Hz e 18 kHz), perceptíveis aos humanos; e faixa dos ultrassons (superior a 18 kHz). A faixa de ultrassons pode ser dividida nas faixas de baixa frequência (entre 16 kHz e 1 MHz) e de alta frequência (superior a 1 MHz) (MASON et al., 2005).

O ultrassom de alta intensidade em baixas frequências de 20 a 100 kHz tem utilidade na inativação de microrganismos para o processamento de alimentos (PIYASENA et al., 2003).

A morte celular é dada principalmente devido ao enfraquecimento das membranas celulares, aquecimento localizado e produção de radicais livres. A destruição e desintegração de microrganismos pelas ondas ultrasônicas está relacionada à formação de bolhas durante o processo de cavitação (SÃO JOSÉ, 2013).

A cavitação gera energia mecânica e química localizada e é o mecanismo de ação do ultrassom sobre os microrganismos (GOGATE e KABADI, 2009).

O processo de cavitação é dado por crescimento e colapso de bolhas em líquido exposto à irradiação de ondas ultrasônicas de baixa frequência. As ondas ultrassônicas se propagam através de um meio líquido em ciclos de alternância entre compressão e expansão (GOGATE e KABADI, 2009). Assim, durante os sucessivos ciclos de compressão e expansão, ocorre aumento das dimensões das bolhas, até em alcance do diâmetro crítico, implodindo exageradamente, gerando

micro jatos que provocam a lise celular (ROSÁRIO, 2016).

Vários trabalhos (CAO et al., 2010; SAGONG et al., 2011; CHEN e ZHU, 2011; SÃO JOSÉ, 2015, ROSÁRIO, 2016; LUO et al., 2016) mostram a inativação de microrganismos por ultrassom em combinação ou não com outros tratamentos.

A utilização do ultrassom associado a agentes químicos permite a penetração desses agentes oxidantes através da membrana celular dos microrganismos. A cavitação auxilia também na desagregação de microrganismos presentes na superfície, aumentando assim a eficiência dos sanitizantes químicos (GUERRERO et al., 2001; GIL et al., 2009; GOGATE e KABADI, 2009). O ultrassom pode provocar também perturbações internamente à célula dos microrganismos. Pode ocorrer cavitação intracelular e choques mecânicos prejudicando os componentes celulares estruturais e funcionais levando à lise celular (CHEMAT et al., 2011).

Huang et al. (2006) combinaram o ultrassom 170 kHz com dióxido de cloro 20 mg.L<sup>-1</sup> e alcançaram uma redução de cerca de 4 log UFC.g<sup>-1</sup> na população de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 em alfaces.

Rosário (2016), após utilizar o ultrassom combinado ao ácido peracético 40 mg.L<sup>-1</sup>, em morango aderidos com *Salmonella*, conseguiu redução a níveis não detectáveis pela técnica de contagem padrão em placas, após uma adesão inicial de 6,80 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Os efeitos promissores no processamento e conservação de alimentos proporcionados pelo ultrassom geraram um aumento, nos últimos anos, nos estudos que envolvem a aplicação do ultrassom na área de ciência e tecnologia de alimentos (ADEKUNTE et al., 2010a; ADEKUNTE et al., 2010b; CAO et al., 2010; SORIA e VILLAMIEL, 2010; TIWARI et al., 2010; CHEN e ZHU, 2011; CHEMAT et al., 2011; SÃO JOSÉ e VANETTI, 2012; SAGONG et al., 2013; ROSÁRIO, 2016; LUO et al., 2016).

Além do seu potencial em remover/inativar microrganismos o ultrassom possui outras vantagens que o tornam uma excelente alternativa para indústria de alimentos. O ultrassom tem sido considerado como tecnologia verde, pelo seu excelente papel na sustentabilidade do meio ambiente (CHEMAT et al., 2011)

Outra vantagem da utilização do ultrassom na indústria de alimentos é o fato de não gerar odores desagradáveis e nem perda de nutrientes (LEE et al., 2004; PIYASENA et al., 2003), por ser aplicado à temperatura ambiente e sem geração de

calor (FERNANDES e RODRIGUES, 2007).

Munkacsi e Elhami (1976) realizaram um dos primeiros estudos utilizando o ultrassom para remoção/inativação de microrganismos, a redução observada foi de 93% dos coliformes presentes em amostras de leite integral tratadas.

A maioria dos estudos com ultrassom eram realizados em sistemas líquidos (SAN MARTÍN et al., 2001; GUERRERO et al., 2001; ZENKER et al., 2003), porém, atualmente, sabe-se que estas ondas podem possuir um excelente efeito sobre microrganismos contaminantes em alimentos sólidos ( CHEN et al., 2011; SÃO JOSÉ e VANETTI, 2012; ROSÁRIO, 2016; LUO et al., 2016).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os repolhos roxos foram adquiridos em um estabelecimento comercial da cidade de Alegre - ES. Estes foram entregues no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo. As amostras foram mantidas a 5 °C por no máximo 24 horas antes do início das análises. As folhas da hortaliça foram selecionadas, descartando as que apresentaram injúrias, fatiadas manualmente e disponibilizadas para o experimento.

#### **3.1 Aplicação dos tratamentos**

Após seleção e descarte das folhas injuriadas os repolhos foram fatiados manualmente, retirando-se o seu caule, em fatias de aproximadamente meio centímetro. Após homogeneização, as amostras foram divididas em 500 g para cada tratamento.

Foram preparadas soluções de 1,5 L para os procedimentos de sanitização isolados e soluções de 4,0 L para os procedimentos de sanitização combinados ao ultrassom. Cada procedimento de sanitização: dicloroisocianurato de sódio (Sumaveg<sup>®</sup>) [100 mg.L<sup>-1</sup>], cloreto de benzalcônio (Vetec<sup>®</sup>) [1200 mg.L<sup>-1</sup>], hipoclorito de sódio (Alphatec) [100 mg.L<sup>-1</sup>], todos procedimentos anteriores combinados ao ultrassom [40 kHz, 500 W], somente ultrassom [40 kHz, 500 W], água destilada e água potável (controle) foram aplicados às amostras por um tempo de 5 minutos. Foi utilizado o ultrassom de banho modelo Soniclean 15 (Sanders Medical<sup>®</sup>) com frequência de 40 kHz e potência de 500 W. As concentrações do dicloroisocianurato de sódio e do hipoclorito de sódio foram baseadas nas concentrações comumente utilizadas pelas indústrias de alimentos. A concentração utilizada para o cloreto de benzalcônio foi baseada no trabalho de Zerdas (2009).

As amostras de repolho roxo tratadas foram acondicionadas, em embalagens plásticas de poli(Tereftalato de Etileno) (PET), e incubadas, sob temperatura de refrigeração (8 ± 1 °C) por 7 dias.

#### **3.2 Avaliação do pH das soluções**

O pH das soluções foi determinado de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Foi utilizado pHmetro digital modelo mPA-210, marca

TecnoPON, com inserção do eletrodo diretamente na amostra (São Paulo, Brasil). O aparelho foi previamente calibrado e operado de acordo com as instruções do manual do fabricante.

### **3.3 Avaliação da microbiota do repolho roxo**

Os procedimentos nesta etapa do trabalho foram realizados de acordo com as metodologias descritas no Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água (SILVA et al., 2010). Foram determinadas bactérias mesófilas aeróbias, coliformes totais, *E. coli*, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de repolho roxo (UFC.g<sup>-1</sup>).

Logo após as amostras de repolho serem submetidas aos diferentes tipos de sanitização foi quantificada a microbiota natural das amostras da mesma maneira.

As análises microbiológicas das amostras de repolho roxo foram realizadas em 4 tempos de armazenamento: tempo 1 (imediatamente após os procedimentos de sanitização), tempo 2 (2 dias após os procedimentos de sanitização), tempo 3 (4 dias após os procedimentos de sanitização), tempo 4 (7 dias após os procedimentos de sanitização). As amostras foram armazenadas em bandejas rígidas de PET com tampa.

#### **3.3.1 Contagem de bactérias mesófilas aeróbias**

A determinação de bactérias mesófilas aeróbias das amostras foi realizada pela técnica de plaqueamento por profundidade utilizando o ágar padrão para contagem (Himedia<sup>®</sup>, Mumbai, Índia), em que 1 mL das diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri, em seguida, aproximadamente 15 mL de ágar Padrão para Contagem (PCA) no estado líquido (aproximadamente 45 °C) foram adicionados nas placas. Por fim, foi feita a homogeneização da amostra na placa e incubação destas invertidas em estufas bacteriológicas a 35 °C por 48 horas (SILVA et al., 2010).

#### **3.3.2 Contagem de coliformes totais e *E.coli***

Placas Petrifilm EC<sup>®</sup> (3M<sup>®</sup>, Maplewood, Estados Unidos) foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diluições apropriadas, seguindo as instruções do

fabricante. Após incubação das placas a 35°C por 24 e 48 h, as colônias azuis e vermelhas com gás foram consideradas colônias de coliformes totais e colônias azuis com gás foram consideradas de *E. coli*. Os resultados foram expressos em UFC.g<sup>-1</sup> (SILVA et al., 2010).

### **3.3.3 Contagem de bactérias lácticas**

A contagem de bactérias lácticas foi realizada por plaqueamento em profundidade utilizando ágar MRS (Merck®, Darmstadt, Alemanha). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose à 35 °C por 72 h. Os resultados foram expressos em UFC.g<sup>-1</sup> (SILVA et al., 2010).

### **3.3.4 Contagem de fungos filamentosos e leveduras**

Para enumeração de fungos filamentosos e leveduras, foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície. Foram inoculados 0,1 mL das diluições apropriadas sobre a superfície do meio ágar Batata Dextrose (BDA) (Himedia®, Mumbai, Índia) acidificado com 1% de ácido tartárico (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) a 10% (v/v) (pH entre 3,5 e 3,7). Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio, e logo após as placas foram incubadas a 25 °C por 5 a 7 dias. Os resultados foram expressos em UFC.g<sup>-1</sup> (SILVA et al., 2010).

## **3.4 Avaliação da remoção/inativação de *Salmonella***

### **3.4.1 Avaliação da eficiência na inativação/remoção de células de *Salmonella* intencionalmente adicionadas à superfície do repolho roxo**

Os procedimentos de sanitização que apresentaram os melhores resultados na redução da microbiota do repolho roxo e nas características físico-químicas e nutricionais foram selecionados para a contaminação desafio utilizando *Salmonella*. Este teste foi realizado para avaliar a capacidade dos sanitizantes inativarem ou removerem células de *Salmonella* intencionalmente adicionadas às amostras de repolho roxo.

### **3.4.2 Preparo das amostras**

As folhas de repolho roxo (25 g) foram selecionadas e cortadas manualmente de maneira asséptica em pedaços de tamanho 3 cm x 3 cm antes de serem

inoculadas com células de *Salmonella* (LUO e OH, 2016).

### 3.4.3 Preparo do inóculo

*Salmonella enterica* Typhimurium ATTC 13076 foi obtida do estoque de cultura do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos do CCAE/UFES. A cultura foi mantida em tubos *Eppendorf* de 1 mL contendo BHI à temperatura de -80 °C e foi feita sua ativação por duas repicagens consecutivas em BHI e incubada à 37 °C por 24 h. Em seguida, os tubos de BHI com as células foram centrifugados a 3000 *g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de água peptonada esterilizada 0,1%. Após esse procedimento o inóculo apresentava contagem em torno de  $10^8$  e  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, confirmado por plaqueamento em superfície de ágar Hektoen (Himedia®, Mumbai, Índia) .

### 3.4.4 Inoculação das amostras de repolho roxo

Cada pedaço cortado da amostra de repolho roxo foi inoculado com 0,1 mL da suspensão de *S. Typhimurium* em três diferentes pontos. Depois disso, as amostras contaminadas foram mantidas na capela por 30 minutos a fim de garantir a adesão suficiente das células nas amostras. Uma contagem inicial do patógeno de aproximadamente 6,0 log UFC.g<sup>-1</sup> pode ser obtida depois desse procedimento (LUO e OH, 2016).

Posteriormente, as 25 g das amostras contaminadas foram imersas em 500 mL da solução de sanitização por 5 min. Amostras não sanitizadas e amostras apenas tratadas em água destilada foram utilizadas como controles.

### 3.4.5 Quantificação das células de *Salmonella* aderidas ao repolho

Após a aplicação de cada procedimento de sanitização, 25 g de amostras de repolho roxo foram transferidos para sacos plásticos esterilizados, contendo 225 mL de água peptonada 0,1% e então, homogeneizados em *stomacher* por dois minutos. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 1 mL para preparar as diluições decimais a serem plaqueadas pela técnica de espalhamento em superfície em ágar Hektoen (Himedia®, Mumbai, Índia). Após a incubação por 18 a 24 h a 37°C foi realizada a contagem das colônias expressa em UFC.g<sup>-1</sup> e UFC.cm<sup>-2</sup> de repolho (LUO e OH,

2016).

Após os procedimentos de sanitização, também foi realizada análise da solução de sanitização, utilizando a mesma técnica utilizada para quantificar as células de *Salmonella* depois dos procedimentos de sanitização, descrita no item 3.4.5, para verificar se o sanitizante aplicado promoveu remoção ou inativação das células de *Salmonella*. Após a coleta das amostras das soluções sanitizantes, estas foram submetidas a diluições adequadas e plaqueamentos em ágar Hektoen. Além disso, para complementar os resultados foi realizada, com o auxílio de um luminômetro (UNI-LITE®Xcel - Biotrace®) e o 3M swab Clean-Trace™ Water ATP, a medida de ATP da solução de sanitização.

### **3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada no laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo em Vitória- ES.

A MEV é capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. Fornece aumentos de mais de 300.000 vezes, para materiais sólidos, com imagens tridimensionais, conservando a profundidade do campo, sendo compatível com a observação de superfícies rugosas. A MEV pode fornecer informações sobre a morfologia de componentes sólidos, e diferentemente de aparelhos convencionais (DEDAVID, 2007), sendo capaz de detectar resoluções de 1nm (NAGATANI et al. 1987).

Os cortes das folhas do repolho roxo, com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram enxaguados em tampão fosfato (PBS) 0,05 mol·L<sup>-1</sup>, pH 6,8 a 7,2, para remoção dos resíduos dos sanitizantes e células não aderidas. A etapa de fixação consistiu do tratamento com glutaraldeído a 5% e tampão PBS 0,1 mol·L<sup>-1</sup>, na proporção de 1:1 por uma hora e meia em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas seis lavagens, de 10 min cada, em tampão PBS a 0,05 mol·L<sup>-1</sup>, pH 6,8 a 7,2. A etapa da desidratação consistiu de tratamentos seriados em etanol, nas graduações de 30 °, 50 °, 70 °, 80 °, 95 °GL, por 10 min cada e três tratamentos de 15 min, em etanol 100 ° GL. Os cupons foram transferidos para o secador ao ponto crítico (modelo CPD 30, Leica) para a desidratação total. Por último, foram metalizados em metalizador (modelo Desk V, Denton Vacuum) para posterior observação ao microscópio eletrônico de varredura (*Scanning Eletron Microscope*, modelo JSM- 6610LV, Jeol) e

registro das imagens.

### **3.6 Análises físico-químicas do repolho roxo**

Foram realizadas as análises de acidez titulável total, pH, teor de sólidos solúveis, perda de massa, cor e teor de antocianinas.

#### **3.6.1 Acidez titulável**

A acidez total titulável foi realizada, utilizando solução padrão de NaOH 0,1 N e pHmetro. A titulação com NaOH foi realizada até a mudança de cor da solução que corresponde ao ponto de viragem da fenolftaleína (pH 8,2 a 8,4). Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico, utilizando a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005).

#### **3.6.2 pH**

O pH foi determinado em pHmetro digital modelo mPA-210, marca Tecnopon (São Paulo, Brasil). Foram pesados 10 g da amostra e estas foram homogeneizadas em 100 mL de água destilada (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O aparelho foi previamente calibrado e operado de acordo com as instruções do manual do fabricante.

#### **3.6.3 Teor de sólidos solúveis**

O teor de sólidos solúveis foi determinado utilizando refratômetro de bancada. As leituras foram realizadas utilizando três gotas do sumo da amostra de repolho roxo triturada e filtrada em bomba a vácuo. Os resultados foram expressos em °Brix (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

#### **3.6.4 Perda de Massa**

Determinou-se a perda de massa pela pesagem das bandejas, contendo aproximadamente 100 g de repolho picado, em balança analítica, Marconi® modelo 2014N (São Paulo, Brasil) nos tempos 0, 2, 4 e 7 dias. A perda de massa para cada tempo foi calculada com base no peso inicial, e a perda no primeiro dia (tempo de 0

dias) foi considerada zero. Os resultados foram expressos em porcentagem de perda total (%) em relação ao peso inicial (Rosário, 2016).

### **3.6.5 Cor**

A cor instrumental das amostras de repolho roxo foi realizada utilizando o colorímetro pela leitura direta de reflectância do sistema de coordenadas retangulares “L\*” (luminosidade), “a\*” (intensidade de vermelho e verde) e “b\*” (intensidade de amarelo e azul), empregando-se a escala de cor CIELAB, com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°, utilizando-se colorímetro Konica Minolta. Os valores de c\* (cromaticidade ou saturação de cor) e h° (ângulo de tonalidade cromática) foram calculados automaticamente pelo aparelho.

### **3.6.6 Determinação do teor de antocianinas**

O teor de antocianina das amostras de repolho roxo foi quantificado segundo adaptação do método espectrofotométrico proposto por Francis (1982).

Para o preparo do extrato, foram pesados 5 g de amostra de repolho-roxo e adicionados 50 mL de etanol/água (70:30 v/v). O pH da solução foi ajustado para 2 com o auxílio de uma solução de HCl 3 mol/L. A solução permaneceu em repouso por 12 horas a 8°C, ao abrigo da luz. Após, a solução foi filtrada à vácuo e o filtrado diluído (1:10 v/v) em etanol-HCl 1,5 mol/L para a leitura da absorbância, em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS® 2000 UV), com comprimento de onda de 535 nm.

O teor de antocianina foi expresso em cianidina-3-glicosídeo na matéria seca.

## **3.7 Análise sensorial do repolho roxo**

Os procedimentos de sanitização que obtiverem os melhores resultados para as características microbiológicas e físico-químicas das amostras de repolho roxo foram selecionados para análise sensorial visual. Foram avaliados aspectos visuais de cor e textura. Os testes foram realizados no laboratório de Análise Sensorial de Alimentos do CCA/UFES. Por envolver pesquisa com humanos o projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética (CAAE: 17560413.4.0000.5060, número do parecer: 324.918)

### **3.7.1 Teste de diferença de comparação múltipla**

Foi realizados teste de comparação múltipla para verificar se existe diferença visual perceptível e o grau desta diferença para atributos de cor e textura entre a amostra controle de repolho roxo (tratada apenas água destilada) e amostras sanitizadas com o dicloroisocianurato de sódio associado ou não ao ultrassom. Trinta e cinco avaliadores realizaram os testes para atributos de cor e de textura. Nestes testes, cada avaliador recebeu quatro amostras em estudo: a amostra tratada somente com água, representando a amostra referência (codificada com a letra R), e mais três amostras codificadas (duas referentes ao DC e DC+US e uma amostra igual à referência). Os avaliadores apenas visualizaram as amostras e compararam cada uma, avaliando o grau de diferença (dos atributos em estudo, seja de cor ou textura) em relação à amostra referência. Para calcular este grau de diferença foi utilizada uma escala própria para o teste variando de 1 a 9, em que 1 foi referente a amostras que apresentaram extremamente menos cor ou textura que a amostra controle e 9 extremamente mais cor ou textura que a amostra controle. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) (DUTCOSKY, 2011),

### **3.7.2 Teste de aceitação**

Amostras de repolho roxo tratadas com DC e DC+US e a amostra controle (tratadas apenas com água) foram submetidas ao teste de aceitação sensorial. Setenta e dois consumidores participaram do teste de aceitação. As amostras foram servidas em pratos descartáveis codificados, apresentadas de forma aleatória e monádica (REIS e MINIM, 2010).

Cada julgador recebeu uma ficha contendo a escala hedônica de nove pontos (variando de “gostei extremamente” a “desgostei extremamente”) para avaliar a impressão global das amostras de repolho roxo (REIS e MINIM, 2010).

Para verificar a existência de diferença estatística entre os resultados de aceitação das amostras, realizou-se ANOVA (REIS e MINIM, 2010).

## **3.9 Planejamento Experimental e Análise Estatística dos Dados**

Para comparar o efeito dos diferentes os procedimentos de sanitização sobre a microbiota e sobre as características físico-químicas do repolho roxo durante o período de armazenamento, o experimento foi conduzido por um delineamento em

blocos casualizados, em parcelas subdivididas, onde o fator sanitizante, representando a parcela, teve 9 níveis e o fator tempo, representando a subparcela, foi composto por 4 níveis, o que totalizou 36 tratamentos. Os níveis do fator sanitizantes foram representados pelos procedimentos de sanitização conforme a Tabela 1. Cada parcela foi subdividida em 4 subparcelas, representada pelos níveis do fator tempo (tempos de 0, 2, 4 e 7 dias de armazenamento).

Tabela 1- Procedimentos de sanitização testados no repolho roxo

Sanitizantes	Concentração
Sem sanitizar (Controle)	-
Água Destilada	-
Hipoclorito de Sódio (HIP)	100 mg.L <sup>-1</sup>
Dicloroisocianurato de Sódio (DC)	100 mg.L <sup>-1</sup>
Cloreto de Benzalcônio (CB)	1200 mg.L <sup>-1</sup>
Ultrassom (US)	-
Ultrassom + Hipoclorito de Sódio (US+HIP)	100 mg.L <sup>-1</sup>
Ultrassom + Dicloroisocianurato de Sódio (US+DC)	100 mg.L <sup>-1</sup>
Ultrassom + Cloreto de Benzalcônio (US+CB)	1200 mg.L <sup>-1</sup>

\*Sanitizantes: hipoclorito, dicloroisocianurato de sódio, cloreto de benzalcônio e Ultrassom. Controle: água destilada e sem sanitizar.

O experimento foi realizado em três repetições. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Duncan a 5% de significância ou análise de regressão.

No teste de contaminação desafio utilizando *Salmonella*, foram estudados os sanitizantes que apresentaram os melhores resultados na redução da microbiota natural, manutenção das características físico-químicas e nutricional. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Duncan a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Genes<sup>®</sup> (CRUZ, 1997).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 pH das soluções sanitizantes

O pH tem importante efeito sobre a ação de sanitizantes químicos a base de cloro na inativação de microrganismos. O pKa do ácido hipocloroso é 7,5, logo o composto clorado orgânico, dicloroisocianurato de sódio, apresenta vantagem quando comparado ao hipoclorito de sódio uma vez que no pH da solução há o predomínio da forma não dissociada do ácido hipocloroso (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de pH nas soluções utilizadas nos procedimentos de sanitização do repolho roxo anteriormente ao processo de sanitização

Sanitizantes	Médias $\pm$ desvio padrão*
Hipoclorito de Sódio	9,24 $\pm$ 0,06
Água destilada	6,71 $\pm$ 0,05
Dicloroisocianurato de sódio	6,21 $\pm$ 0,02
Cloreto de benzalcônio	5,69 $\pm$ 0,06

A ação dos compostos clorados se torna mais efetiva quando em pH baixo pois compostos a base de cloro, com exceção do dióxido de cloro, liberam em meio aquoso e em pH abaixo da sua constante de equilíbrio ( $pK_a = 7,5$ ), moléculas de ácido hipocloroso na forma não dissociada (HClO). Essas moléculas possuem uma grande capacidade de penetração na célula bacteriana. Sua ação bactericida se torna 80 vezes maior que a forma dissociada. Em pH alto, o equilíbrio da reação tende à formação de íons de hidrogênio  $H^+$ , como a parede celular bacteriana possui carga elétrica, ocorre a repulsão destes íons, diminuindo a sua ação bactericida (ANDRADE, 2008).

Fantuzzi e colaboradores (2004), avaliando procedimentos de sanitização em repolho, observaram valores de pH entre 7,5 e 8,5 para solução de dicloroisocianurato de sódio  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  e em torno de 11 para hipoclorito de sódio  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ , obtendo, desta forma, menor ação do clorado inorgânico na sanitização dos repolhos.

## 4.2 Microbiota do repolho roxo no período de armazenamento

O resumo da Análise de Variância da contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes totais, bactérias lácticas e fungos filamentos e leveduras em repolhos roxos durante o período de armazenamento por 7 dias a  $8 \pm 1$  °C está apresentado na Tabela 3. A fonte de variação sanitizante foi significativa ( $p < 0,05$ ) para todos os grupos microbianos avaliados, exceto fungos filamentosos e leveduras. Já o tempo de armazenamento foi significativo apenas para o grupo de bactérias mesófilas aeróbias. Não foi observada interação entre os sanitizantes e o tempo de armazenamento, assim, estas fontes de variação atuam de maneira independente.

Tabela 3 - Resumo da Análise de Variância (ANOVA) da contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes totais, bactérias lácticas e fungos filamentos e leveduras em repolhos roxos armazenados por 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

Variável	Fonte de Variação	Grau de liberdade	Valor de F
Bactérias mesófilas aeróbias	Sanitizante	8	0,00*
	Tempo	3	0,00*
	Interação	24	100,00 <sup>n.s.</sup>
Coliformes Totais	Sanitizante	8	10,50*
	Tempo	3	0,96 <sup>n.s.</sup>
	Interação	24	0,80 <sup>n.s.</sup>
Bactérias Lácticas	Sanitizante	8	20,40*
	Tempo	3	1,62 <sup>n.s.</sup>
	Interação	24	0,65 <sup>n.s.</sup>
Fungos Filamentosos e Leveduras	Sanitizante	8	1,44 <sup>n.s.</sup>
	Tempo	3	0,71 <sup>n.s.</sup>
	Interação	24	0,48 <sup>n.s.</sup>

\*significativo ( $p < 0,05$ ); n.s.: não significativo ( $p > 0,05$ ).

A etapa de sanitização é fundamental para inocuidade e para qualidade de frutas e hortaliças processadas e mantidas sobre armazenamento. Esta etapa é crítica para redução do número de microrganismos deterioradores e patogênicos. As contagens da microbiota natural do repolho roxo em  $\log \text{UFC.g}^{-1}$  após aplicação dos

sanitizantes estão apresentadas na Tabela 4.

As contagens de bactérias mesófilas aeróbias, bactérias láticas e coliformes totais apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre alguns sanitizantes quando comparados à amostra controle (sem sanitização). A contagem de fungos filamentosos e leveduras, não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os sanitizantes.

Tabela 4 - Médias das contagens da microbiota do repolho roxo em log UFC.g<sup>-1</sup> após a aplicação dos procedimentos de sanitização.

<b>Sanitizantes</b>	<b>Bactérias Mesófilas Aeróbias</b>	<b>Coliformes Totais</b>	<b>Bactérias Lááticas</b>	<b>Fungos e Leveduras</b>
Sem Sanitizar	6,39 ab	3,31 a	4,36 a	3,67 a
Água	6,06 ab	3,05 a	4,35 a	3,57 a
US	5,83 ab	2,98 ab	3,95 a	3,44 a
HIP+US	5,78 ab	2,54 ab	3,18 ab	3,20 a
HIP	5,57 ab	2,64 ab	3,35 ab	3,20 a
DC+US	5,08 b	2,54 ab	3,13 ab	3,36 a
DC	5,24 b	2,14 bc	2,59 b	3,29 a
CB+US	3,87 c	1,41 c	1,15 c	3,01 a
CB	4,16 c	1,68 c	1,13 c	3,05 a

\* Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

As reduções decimais entre as médias de contagem de bactérias mesófilas aeróbias variaram de 0,33 a 2,52 log UFC.g<sup>-1</sup> entre os sanitizantes utilizados (Figura 1). O cloreto benzalcônio (CB) combinado ou não ao ultrassom apresentou reduções decimais, de 2,52 e 2,23 respectivamente, quando comparado ao controle (sem sanitização) diferindo dos demais ( $p > 0,05$ ).

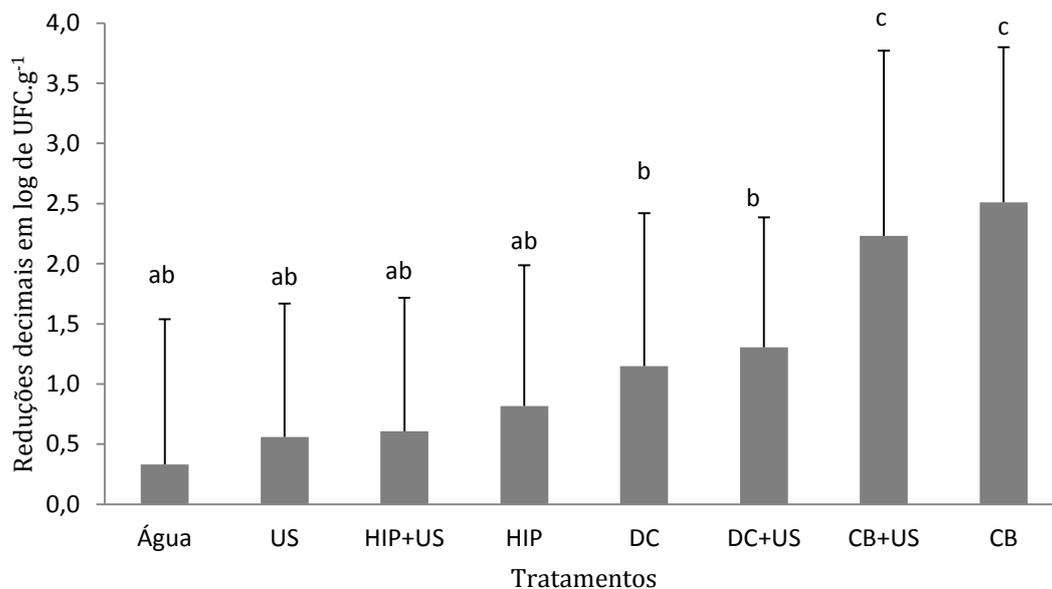


Figura 1 - Reduções decimais em log de UFC.g<sup>-1</sup>, das contagens de bactérias mesófilas aeróbias nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização.

Sanitizantes seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Duncan. CB: Cloreto de benzalcônio; US: Ultrassom; DC: Dicloroisocianurato de sódio; HIP: Hipoclorito de Sódio.

Zerdas (2009) encontrou redução de 1,20 log de UFC.g<sup>-1</sup> em células sésseis de *Salmonella* Enteritidis presentes na superfícies de alface crespa, utilizando a mesma concentração de CB (1200 mg.L<sup>-1</sup>), porém por um período de tempo maior, de 10 minutos.

O CB possui um largo espectro de atividade antimicrobiana, atuando sobre bactérias, fungos e leveduras. Segundo Machado (2009) como composto ativo nas superfícies, o CB, quando usado em concentrações de 1 a 2%, reduz a tensão superficial da água, provocando uma excelente umidificação e penetração (MACHADO, 2009). As moléculas de CB, por constituírem um tensoativo, são formadas por uma parte apolar/hidrofóbica, formada pela cauda, e outra polar/hidrofílica, onde forma-se a cabeça. Essas moléculas reduzem a tensão interfacial líquido-superfície, intensificando a ação bactericida dos compostos. O mecanismo de ação do CB é dado pela sua adsorção à superfície da membrana da célula microbiana e reação com fosfolipídios que compõem a membrana citoplasmática, ocorrendo também, uma reação química com cargas negativas dos

íons associados à parede celular (LUTEY, 1995). Assim, essas reações acabam gerando um estresse provocando a perda de constituintes citoplasmáticos e consequente morte celular (ZERDAS, 2009).

Apesar da eficiência do CB na redução da população de bactérias mesófilas aeróbias, este sanitizante ocasionou injúrias e forte deterioração nas amostras de repolho roxo, tornando-as visivelmente inaceitáveis.

O dicloroisocianurato de sódio e hipoclorito de sódio não diferiram ( $p < 0,05$ ) do ultrassom isoladamente, o que demonstra que esse poderia substituir compostos clorados para redução de bactérias mesófilas em repolho roxo.

Apesar de serem os mais utilizados pela indústria de alimentos, principalmente aqui no Brasil, os compostos clorados inorgânicos possuem a desvantagem de formarem substâncias nocivas para a saúde. Alguns países estão proibindo a utilização destes compostos como sanitizantes em alimentos devido à formação de substâncias tóxicas (trihalometanos) por se combinarem com a matéria orgânica (ALVARO et al., 2009; GRAÇA et al., 2011; CHEN e ZHU, 2011; RAHMAN et al., 2011).

O DC ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e DC+US ( $100 \text{ mg.L}^{-1}/ 5 \text{ min}$ , 40 kHz, 500 W) reduziram 1,15 e 1,30 log UFC.g<sup>-1</sup> respectivamente. São José (2009), ao utilizar dicloroisocianurato de sódio isoladamente em hortaliças, nas concentrações  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ , encontrou uma redução de apenas 0,9 ciclos log UFC.g<sup>-1</sup> na contagem de contagem de bactérias aeróbias, mesmo que por um período tempo maior que este estudo (10 minutos).

Em estudo realizado por Tan et al. (2015), foi observada redução de 0,61 log de UFC.g<sup>-1</sup> da população de bactérias mesófilas, em nabos, hortaliça pertencente à mesma família do repolho, ao aplicar DC a  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  por 10 minutos. Este resultado foi inferior a redução obtida neste presente estudo, utilizando o mesmo sanitizante em tempo e concentração inferiores.

Durante o período de armazenamento, as bactérias mesófilas aeróbias apresentaram contagens significativamente diferentes, independentemente do sanitizante utilizado, mostrando que houve diferença significativa no tempo, porém não houve interação entre sanitizante e tempo de armazenamento.

Como apresentado na Figura 2 a população de bactérias mesófilas aeróbias, logo após a aplicação dos sanitizantes, representava em média de 4,83 log UFC.g<sup>-1</sup>

e alcançou  $6,16 \log \text{UFC.g}^{-1}$  em 7 dias de armazenamento a  $8^\circ\text{C}$ , apresentando crescimento linear positivo durante o tempo de armazenamento, ou seja, à medida que o período de armazenamento se estendia, aumentava-se a contagem neste grupo. Esse crescimento pode ser consequência da multiplicação de bactérias psicotróficas, que são bactérias capazes de crescerem sob refrigeração, independente de sua temperatura ótima (JAY, 2005).

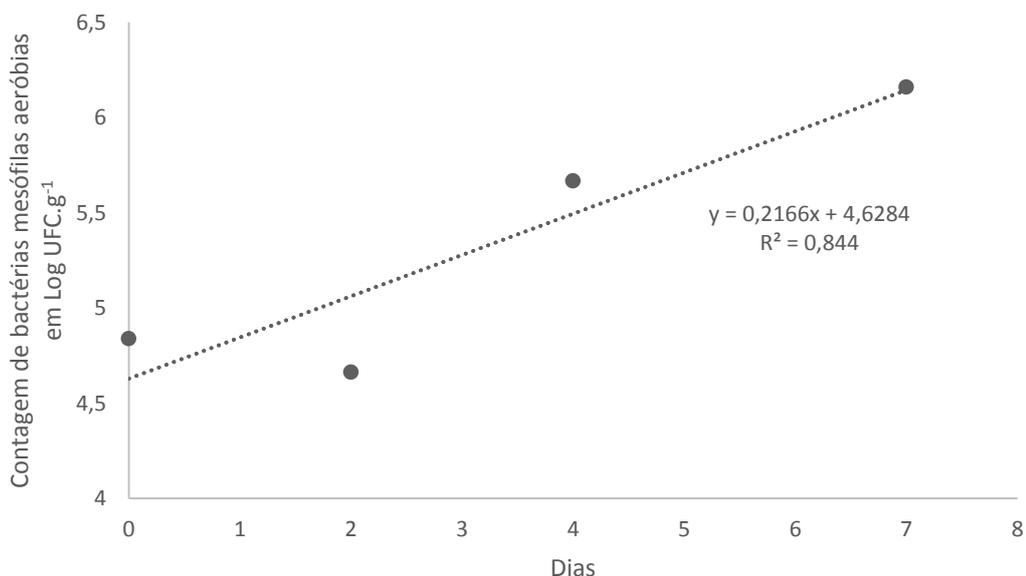


Figura 2- Comportamento da população de bactérias mesófilas aeróbias em  $\log \text{UFC.g}^{-1}$  de repolho roxo durante o armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para Fantuzzi et al. (2004) a população inicial de bactérias mesófilas aeróbias e psicotrófica em repolho não variou durante 20 dias de estocagem, em diferentes tipos de embalagens, com temperaturas de 1 a  $5^\circ\text{C}$ , mantendo-se em torno de  $4 \log \text{UFC.g}^{-1}$ . Assim, afirma-se que a temperatura de  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ , utilizada neste estudo, não foi suficiente para controle da microbiota bacteriana mesófila aeróbia presente no repolho roxo.

A temperatura de  $8 \pm 1^\circ\text{C}$  para o armazenamento das amostras de repolho roxo foi escolhida no intuito de manter-se o estudo mais próximo da realidade, em que a média da temperatura de refrigeração das gôndolas em estabelecimentos comerciais se mantém próxima a  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Froder (2005) encontrou em amostras de repolho roxo minimamente processados, mantidas sobre refrigeração, contagens de  $5,4 \log \text{UFC.g}^{-1}$  de psicotróficos. Já Oliveira et al. (2011) avaliaram a qualidade microbiológica de

vegetais minimamente processados, prontos para consumo, e encontraram uma grande contagem inicial de psicotróficos nas hortaliças pesquisadas. Para o repolho roxo foi encontrada uma contagem inicial de  $8,2 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  desse grupo microbiano. No entanto de acordo com esses autores, todas as amostras apresentarem-se visualmente e olfativamente adequadas para o consumo mesmo com uma alta população inicial de psicotróficos.

Sabe-se que não somente a população bacteriana provoca alterações sensoriais no produto. Com o tempo de armazenamento, alterações físico-químicas também podem contribuir para deterioração de produtos processados e armazenados sobre refrigeração.

Um estudo realizado em 2013, por São José, verificou que após o 10º dia de armazenamento de tomate cereja a  $7 \text{ }^\circ\text{C}$ , uma contagem de  $6,83 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  de bactérias mesófilas aeróbias nos tomates sanitizados por ultrassom 40 kHz por 5 minutos. Resultado semelhante ao encontrado no presente estudo, em que as médias de contagens das bactérias mesófilas no sétimo dia de armazenamento a  $8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  foi de  $6,16 \log$  de  $\text{ UFC.g}^{-1}$ . A resolução da ANVISA, RDC nº 12 de janeiro de 2001, não prevê valores limites para contagens de bactérias mesófilas aeróbias em hortaliças frescas, *in natura*. Porém, sugere-se que, valores acima de  $6 \log$  de  $\text{ UFC.g}^{-1}$  na contagem desse grupo de bactérias, podem comprometer o produto sensorialmente e nutricionalmente, tornando-o impróprio para consumo (PRADO, et al, 2008).

Para coliformes totais foram observadas reduções de  $0,26$  a  $1,90 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  em relação ao controle (Figura 3). O cloreto de benzalcônio apresentou redução de até  $1,90 \log$  de  $\text{ UFC.g}^{-1}$  quando combinado com ultrassom, se diferenciando dos demais sanitizantes, exceto do DC que reduziu  $1,18$  ciclos  $\log$ . Assim como para a população de bactérias mesófilas aeróbias, o ultrassom quando utilizado isoladamente, não diferiu dos compostos clorados, o que indica a possibilidade de substituição para obter a redução da contagem de coliformes totais.

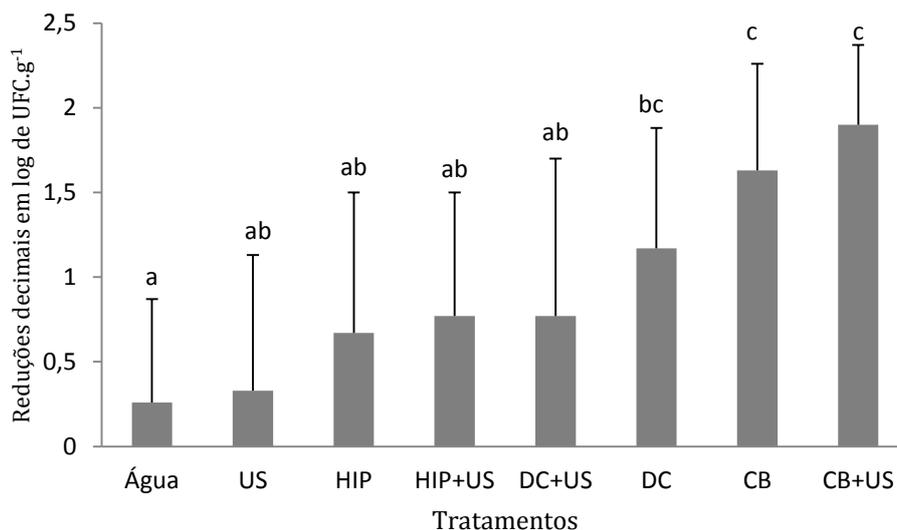


Figura 3- Reduções decimais em log de UFC.g<sup>-1</sup>, das contagens de coliformes totais nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização.

Sanitizantes seguidos por pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Duncan. CB: Cloreto de benzalcônio; US: Ultrassom; DC: Dicloroisocianurato de sódio; HIP: Hipoclorito de Sódio.

A população de bactérias lácticas foi reduzida em 0,01 a 3,23 ciclos log, após a aplicação dos sanitizantes (Figura 4). O cloreto de benzalcônio combinado ou não ao ultrassom apresentou os melhores resultados na redução, 3,23 e 3,21 log de UFC.g<sup>-1</sup>, e diferiu dos demais sanitizantes ( $p < 0,05$ ).

A eficiência do cloreto de benzalcônio, sobre as bactérias lácticas, está ligada ao fato de surfactantes catiônicos serem efetivos na inativação de bactérias gram-positivas. Essas bactérias possuem uma camada espessa de peptidoglicano que favorece a interação com grupamentos amino do surfactante, o que provoca uma perturbação da permeabilidade seletiva da membrana com alteração no balanço de equilíbrio dos íons celulares. Sendo assim, há uma alteração na atividade proteica da célula, o que ocasiona também danos no material genético da bactéria (HU et al., 2014).

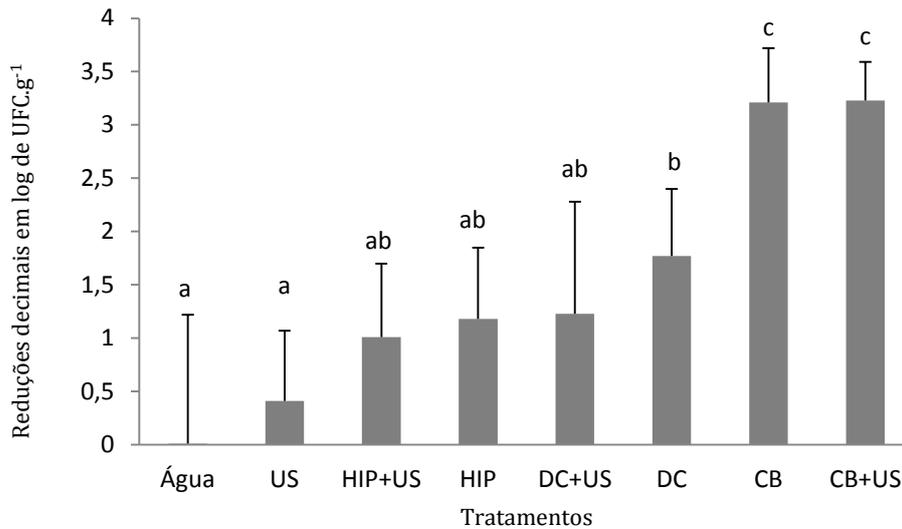


Figura 4 - Reduções decimais em log de UFC.g<sup>-1</sup>, das contagens de bactérias lácticas nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização.

Sanitizantes seguidos por pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Duncan. CB: Cloreto de benzalcônio; US: Ultrassom; DC: Dicloroisocianurato de sódio; HIP: Hipoclorito de Sódio.

O processo de cavitação é mostrado, por alguns estudos, como menos efetivo na inativação de bactérias gram-positivas devido à espessa camada de peptidoglicano (DRAKOPOULOU et al., 2009; CHANDRAPALA et al. 2012). Porém, neste trabalho, o ultrassom manteve a mesma eficiência, do composto clorado inorgânico, na redução de bactérias lácticas, sugerindo uma possível substituição deste sanitizante, por este método, para esse grupo microbiano.

A inativação deste grupo de bactérias se torna fator importante quando relacionado ao aumento da vida útil de produtos armazenados sobre refrigeração. Microrganismos como as bactérias lácticas podem alcançar, muito rápido, contagens maiores que 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>. Esta rápida multiplicação traz resultados negativos, como acúmulo de metabólitos como o etanol, ácido lático e acetato de etila, entre outros provocadores de deterioração (Guerzoni et al., 1996).

Os sanitizantes avaliados alcançaram somente 0,1 a 0,62 log de UFC.g<sup>-1</sup> de redução na população de fungos filamentosos e leveduras (Figura 5) e não diferiram entre si.

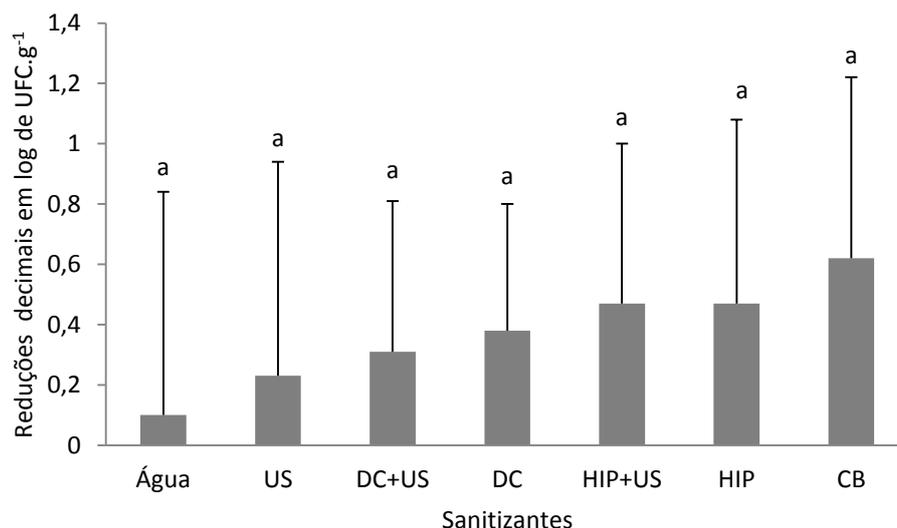


Figura 5 - Reduções decimais em log de UFC.g<sup>-1</sup>, das contagens de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C, quando comparadas ao controle, sem sanitização.

CB: Cloreto de benzalcônio; US: Ultrassom; DC: Dicloroisocianurato de sódio; HIP: Hipoclorito de Sódio.

Apesar da legislação não apresentar valores limites para este grupo de microrganismos em hortaliças, Ferreira e colaboradores (2002), recomendam contagens abaixo de 4 log de UFC.g<sup>-1</sup>, pelo fato de que, contagem acima destes valores, poderiam contribuir para produção de micotoxinas.

De maneira geral, o ultrassom testado neste trabalho, não diferiu dos compostos à base de cloro. O efeito do ultrassom está ligado ao processo de cavitação que consiste na formação, crescimento e o colapso de bolhas, promovendo uma energia mecânica e química localizada que inativa os microrganismos (GOGATE e KABATI, 2009). Esse tratamento é classificado como não térmico, pois não gera calor e tem como destaque positivo o fato de não alterar as características nutricionais do produto ou produzir algum odor desagradável no alimento (FERNANDES e RODRIGUES, 2007). A partir disso sugere-se o ultrassom como uma alternativa para a indústria de alimentos para redução da microbiota deterioradora de repolho roxo.

#### 4.3 Efeito dos sanitizantes sobre as características físico-químicas do repolho

Entre as variáveis físico-químicas estudadas apenas a perda de massa

apresentou o mesmo comportamento ( $p>0,05$ ), em relação aos sanitizantes aplicados (Tabela 5).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância (ANOVA) dos resultados de antocianinas, acidez titulável, pH, SST e perda de massa, nas amostras de repolho roxo, submetidas aos sanitizantes armazenados à  $8 \pm 1$  °C por 7 dias.

Variável	Fonte de Variação	Grau de liberdade	Valor de F
Antocianinas	Sanitizante	8	3,48*
	Tempo	3	0,26*
	Interação	24	100,00 n.s.
Acidez Titulável	Sanitizante	8	0,91*
	Tempo	3	100,00 n.s.
	Interação	24	10,00 n.s.
pH	Sanitizante	8	0,00*
	Tempo	3	0,00*
	Interação	24	100,00 n.s.
SST	Sanitizante	8	0,00*
	Tempo	3	0,00*
	Interação	24	4,52*
Perda de Massa	Sanitizante	8	12,91 n.s.
	Tempo	3	0,00*
	Interação	24	7,78 n.s.

\*significativo ( $p<0,05$ ), n.s. não significativo ( $p>0,05$ ).

Os valores de antocianinas, pH, SST e perda de massa foram significativos no tempo, ou seja, a medida que aumentavam-se os dias de armazenamento, essas variáveis apresentavam comportamentos diferentes ( $p<0,05$ ), independente do sanitizante aplicado. Para SST foi observada interação significativa entre as fontes de variação estudadas: sanitizante e tempo de armazenamento. Sendo assim, o comportamento de SST para cada sanitizante aplicado nas amostras apresentou diferença ( $p<0,05$ ) durante o tempo de armazenamento a  $8 \pm 1$  °C por 7 dias.

Em relação às antocianinas, os sanitizantes utilizando cloreto de benzalcônio, isolado ou combinado ao ultrassom, foram os únicos que diferiram do

controle (sem sanitização) levando as maiores porcentagens de perdas de antocianinas de 29,13% e 26,85%, respectivamente (Tabela 6). Foi visível, logo após a sanitização, o efeito deste sanitizante sobre a pigmentação característica do repolho. As amostras de repolho roxo apresentavam-se mais claras e bem danificadas.

Tabela 6 - Médias das concentrações de antocianinas em mg de cianidina-3-glicosídeo/100 g e médias das porcentagens de perda de antocianinas comparadas ao controle (sem sanitizar) das amostras de repolho submetidos aos procedimentos de sanitização e armazenamento por 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

Sanitizantes	mg cianidina-3-glicosídeo/100g	% perda de antocianina
Sem Sanitizar	89,47 a	0
Água	82,00 a	8,35
US	79,96 ab	10,63
HIP+US	78,10 abc	12,70
HIP	77,26 abc	13,65
DC+US	76,04 abc	15,01
DC	74,16 abc	17,11
CB+US	65,45 bc	26,85
CB	63,41 c	29,13

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

A maior porcentagem de redução da antocianina provocada pelo cloreto de benzalcônio pode estar ligada ao mecanismo de ação deste composto químico, e seu potente efeito oxidativo, pois segundo Lutey (1995), os surfactantes podem reagir com as cargas negativas dos íons associados à parede celular. Como não há seletividade, essa oxidação pode abranger também outros compostos presentes nos vegetais.

Os demais sanitizantes não diferiram do controle em relação ao conteúdo de antocianinas. O ultrassom usado isoladamente, e combinado aos compostos clorados, não afetou a concentração de antocianina em relação ao controle.

Durante o tempo de armazenamento, a concentração de antocianinas, apresentou variação significativa. A Figura 6 apresenta a variação deste

comportamento durante os 7 dias de armazenamento a  $8 \pm 1$  °C, em que o modelo quadrático ajustou-se adequadamente aos dados ( $p < 0,05$ ).

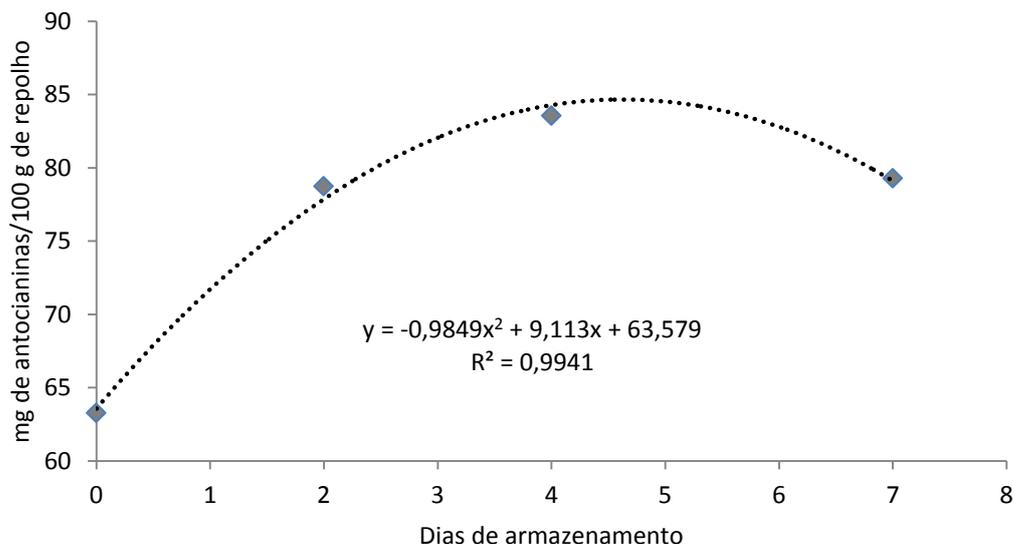


Figura 6- Comportamento de antocianinas nas amostras de repolho roxo em função do tempo de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

Observou-se aumento na concentração de antocianinas até o quarto dia, e após esse tempo, uma redução na concentração. O aumento até o quarto dia pode ser atribuído à perda de massa levando a uma concentração dos compostos. Após o quarto dia, apesar de continuar ocorrendo perda de massa, a taxa de degradação das antocianinas pode ter sido maior do que o efeito de concentração do composto. Em polpa de acerola, Aquino e colaboradores (2011), observaram decréscimo significativo de antocianinas durante o tempo de armazenamento. Freitas e colaboradores (2006) em suco de acerola, atribuíram a redução significativa de antocianinas à variação do pH e ao possível contato do oxigênio atmosférico com as amostras de suco. Segundo Fellows (2006), muitos pigmentos naturais são alterados quimicamente por mudanças de pH e oxidação durante a armazenamento.

Durante o tempo de armazenamento, a perda de massa foi significativa, independente do procedimento de sanitização aplicado ( $p < 0,05$ ). O modelo linear se ajustou aos dados ( $p < 0,05$ ), mostrando que com o passar dos dias a perda de massa aumentava para todos os sanitizantes testados (Figura 7).

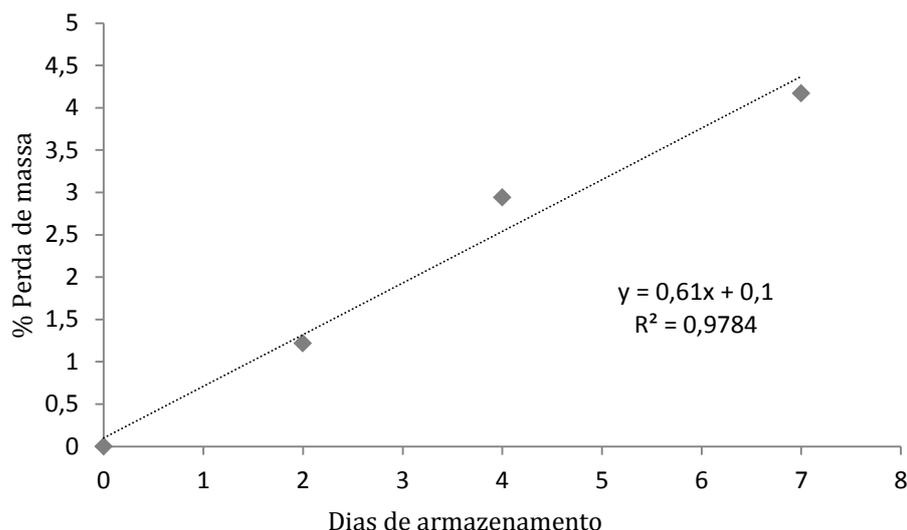


Figura 7- Perda de massa das amostras de repolho roxo em função do tempo de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

Para acidez titulável, o cloreto de benzalcônio tanto isoladamente quanto junto ao ultrassom, foram os únicos que diferiram do controle ( $p < 0,05$ ). Os demais sanitizantes, combinados ou não ao ultrassom, obtiveram o mesmo comportamento quanto à acidez quando comparado ao controle (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores das médias da acidez titulável e pH nas amostras de repolho roxo armazenados durante 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

Sanitizantes	Acidez Titulável	pH
Sem Sanitizar	0,11 a	6,41 a
Água	0,10 ab	6,44 b
US	0,10 ab	6,45 b
HIP+US	0,09 ab	6,46 b
HIP	0,10 ab	6,47 b
DC+US	0,10 ab	6,54 c
DC	0,10 ab	6,53 c
CB+US	0,09 b	6,54 c
CB	0,09 b	6,52 c

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

Foi observada também, diferença no pH das amostras de repolho roxo dependendo sanitizante utilizado. Os sanitizantes que diferiram do controle foram

HIP, DC, DC+US, CB e CB+US. Já durante o período de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C os valores de pH apresentaram comportamento diferentes (Figura 8).

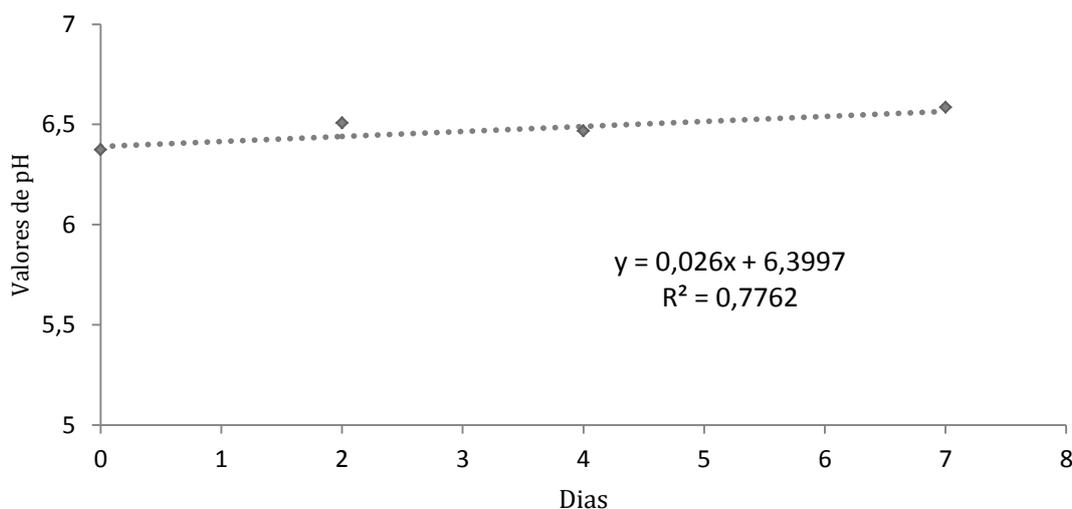


Figura 8- Comportamento do pH das amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

O ultrassom usado isoladamente ou em combinação com os sanitizantes, em exceção ao CB, não alterou os valores de acidez titulável das amostras de repolho roxo em relação ao controle. Ácidos orgânicos estão presentes nos vacúolos das células na forma livre ou combinados a sais, ésteres e glicosídeos. São fonte importante de energia para os vegetais durante o processo de maturação, sofrendo oxidação no ciclo de Krebs (KLUGE et al., 2002), diminuindo assim sua concentração com o tempo de armazenamento ou dependendo do processamento utilizado.

O pH das amostras variou de 6,37 a 6,58, classificando-os como produtos não ácidos. Alimentos não ácidos são mais favoráveis ao crescimento de microrganismos patogênicos, o que prejudica a inocuidade desses produtos (CHITARRA & CHITARRA, 2005), principalmente os consumidos crus, como o repolho.

O aumento do pH durante o tempo de armazenamento está ligado a diminuição da acidez com o tempo de armazenamento e amadurecimento de frutos e hortaliças. Segundo Chitarra & Chitarra (2005), o pH tende a aumentar a medida que a acidez diminui. Foi observado que medida que a acidez diminuía entre os sanitizantes aplicados, os valores de pH aumentavam. A acidez é um índice relevante na avaliação da qualidade dos alimentos. Durante o armazenamento, com

a maturação de frutas e hortaliças o teor de ácido cítrico diminui, resultando em menor acidez (DANTAS, 2010).

Segundo Silva (2009) é comum o aumento do pH em produtos minimamente processados. Sugere-se que o aumento do pH esteja relacionado aos efeitos normais do metabolismo de CO<sub>2</sub> ou reação direta do tecido vegetal que retira o CO<sub>2</sub> do interior de seus tecidos para os vacúolos ou para o ambiente diminuindo a acidez provocada por compostos como o CO<sub>2</sub> (KADER, 1986).

Rinaldi et al. (2009) também encontraram valores de pH próximos aos encontrados no presente estudo, variando entre 5,44 e 6,52 em repolhos minimamente processados embalados em diferentes embalagens, encontrando diferença significativa nos valores de pH durante o armazenamento por 16 dias a 5 ± 1 °C.

Para os atributos de cor, os valores de L\*, b\* e h<sup>0</sup> não apresentaram comportamentos diferentes entre os sanitizantes testados (p> 0,05). Além disso, não houve variação destes parâmetros no tempo de armazenamento de 7 dias a 8 ± 1 °C. Para a coordenada de cor a\*, os sanitizantes apresentaram comportamentos diferentes (p<0,05) e com o passar do tempo de armazenamento, os valores de a\* também se comportaram de formas distintas. Para os valores de c\*, não houve diferença significativa (p>0,05) entre os sanitizantes utilizados neste estudo, porém, durante os 7 dias de armazenamento a 8 ± 1 °C, os valores de c\* se diferenciaram (p<0,05) a medida que os dias iam passando (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo da análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de cor L\*, a\*, b\*, c, h°, nas amostras de repolho roxo, submetidas aos procedimentos de sanitização e armazenadas a 8 ± 1 °C por 7 dias.

Variável	Fonte de variação	Grau de Liberdade	Valor de F
L*	Sanitizante	8	31,82 <sup>n.s.</sup>
	Tempo	3	7,89 <sup>n.s.</sup>
	Interação	24	100,00 <sup>n.s.</sup>
a*	Sanitizante	8	0,00*
	Tempo	3	0,00*
	Interação	24	100,00 <sup>n.s.</sup>
b*	Sanitizante	8	100,00 <sup>n.s.</sup>
	Tempo	3	1,62 <sup>n.s.</sup>
	Interação	24	43,61 <sup>n.s.</sup>
c*	Sanitizante	8	8,83 <sup>n.s.</sup>
	Tempo	3	0,00*
	Interação	24	100 <sup>n.s.</sup>
h°	Sanitizante	8	100,00 <sup>n.s.</sup>
	Tempo	3	100,00 <sup>n.s.</sup>
	Interação	24	46,16 <sup>n.s.</sup>

\*significativo (p < 0,05) n.s. não significativo (p > 0,05).

Pode-se observar que, para os parâmetros de cor a\* os procedimentos utilizando cloreto de benzalcônio, diferiram dos demais (p<0,05), o que pode estar relacionado ao teor de antocianinas observado para estes sanitizantes. A cor de um produto é um fator importante para escolha e aceitação dos consumidores. A coordenada L\* corresponde a luminosidade que varia de preto (L=0) a branco (L=100); a coordenada a\* demonstra a intensidade de vermelho (+a) e verde (-a); já a coordenada b\*, relacionasse com a intensidade de amarelo (+b) a azul (-b) (FARAONI et al., 2009). Os valores de L\* se mantiveram mais próximos de 0, apresentando média de 24,41. Como não foi apresentada diferença entre os sanitizantes estudados quando comparados ao controle (Tabela 9), afirma-se que não houve alteração na luminosidade das amostras. De acordo com os valores

encontrados no presente estudo para os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  e para  $h^0$ , pode-se afirmar que as amostras de repolho roxo apresentaram a coloração entre o vermelho e azul. Fator esse importante quando se leva em consideração as exigências dos consumidores, mesmo expostos aos sanitizantes, os repolhos mantiveram sua cor característica.

Tabela 9 - Médias dos valores dos parâmetros de cor L, a\*, b\*, c\* e h° referentes a cada procedimento de sanitização durante o período de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

Sanitizante	L*	a*	b*	c*	h°
Sem Sanitizar	22,75 a	15,52 a	-11,79 a	18,15 a	335,30 a
Água	24,13 a	16,17 a	-12,04 a	20,26 a	321,12 a
US	15,84 a	15,84 a	-12,33 a	20,26 a	322,22 a
HIP+US	15,54 a	15,54 a	-12,16 a	19,74 a	322,78 a
HIP	16,16 a	16,16 a	-12,35 a	20,61 a	322,92 a
DC+US	15,22 a	15,22 a	-15,99 a	19,94 a	322,22 a
DC	15,73 a	15,72 a	-11,42 a	19,95 a	322,34 a
CB+US	13,54 a	13,53 b	-11,58 a	18,08 a	321,92 a
CB	13,50 a	13,50 b	-12,05 a	18,33 a	322,15 a

Médias seguidas de pelo menos uma pela mesma letra, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

O parâmetro  $c^*$ , ou croma, é um atributo quantitativo para determinação de cores. É ele quem determina o grau de diferença entre uma cor comparada a uma cor cinzenta, ou seja, o valor de  $c^*$  representa a saturação da cor. O ângulo  $h^\circ$  é determinado pela tonalidade, o que possibilita a diferenciação das cores, um ângulo de  $0^\circ$  ou  $360^\circ$  representa tonalidade vermelha, enquanto ângulos de  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  e  $270^\circ$  representam tons de amarelo, verde e azul, respectivamente (PATHARE et al., 2013). As médias dos valores de  $h^\circ$ , no presente estudo, foram de  $323,66$  enquadrando as amostras de repolho roxo nas coordenadas de cor vermelho/azuladas.

A Figura 9 traz a média dos valores de  $c^*$  e sua variação durante o tempo de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ . O modelo linear se ajustou perfeitamente aos dados, onde observa-se que com o passar dos dias de armazenamento, um decréscimo nos valores do parâmetro  $c^*$ .

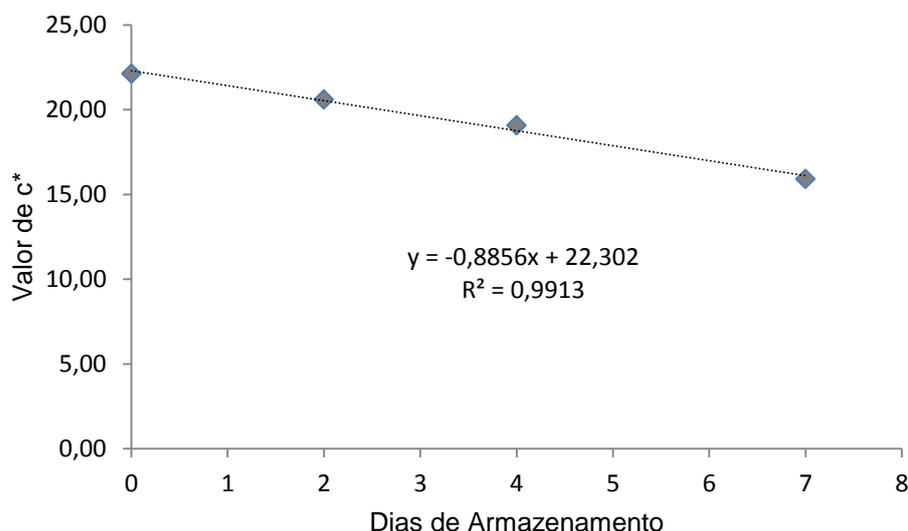


Figura 9 - Comportamento do parâmetro de cor  $c^*$  nas amostras de repolho roxo durante o período de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Segundo Conti et al. (2002), frutos com maior homogeneidade de cor possuem valores de  $c^*$  acima de 36,08. No presente estudo, o repolho roxo, apresentou médias de 19,42, fato este ligado à sua característica de cor natural.

Aday et al. (2013) ao avaliarem o efeito do ultrassom (20 kHz) em morangos, nas coordenadas de cor  $L^*$  e  $a^*$ , não observaram diferença entre os procedimentos utilizando ultrassom e o controle. Rosário (2016) também não observou alteração nos parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c$  e  $h^\circ$  em morangos tratados por ultrassom (40 kHz/5 min) combinados ou não a sanitizantes.

Para SST a interação entre os sanitizantes e o tempo de armazenamento foi significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5), assim é necessário fazer o desdobramento de um fator dentro do outro. Porém, não foi possível ajustar nenhum modelo que explicasse satisfatoriamente a variação de SST nas amostras de repolho roxo em função do tempo de armazenamento.

O comportamento da concentração de SST para os diferentes sanitizantes em função do tempo de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C é apresentado na Figura 10.

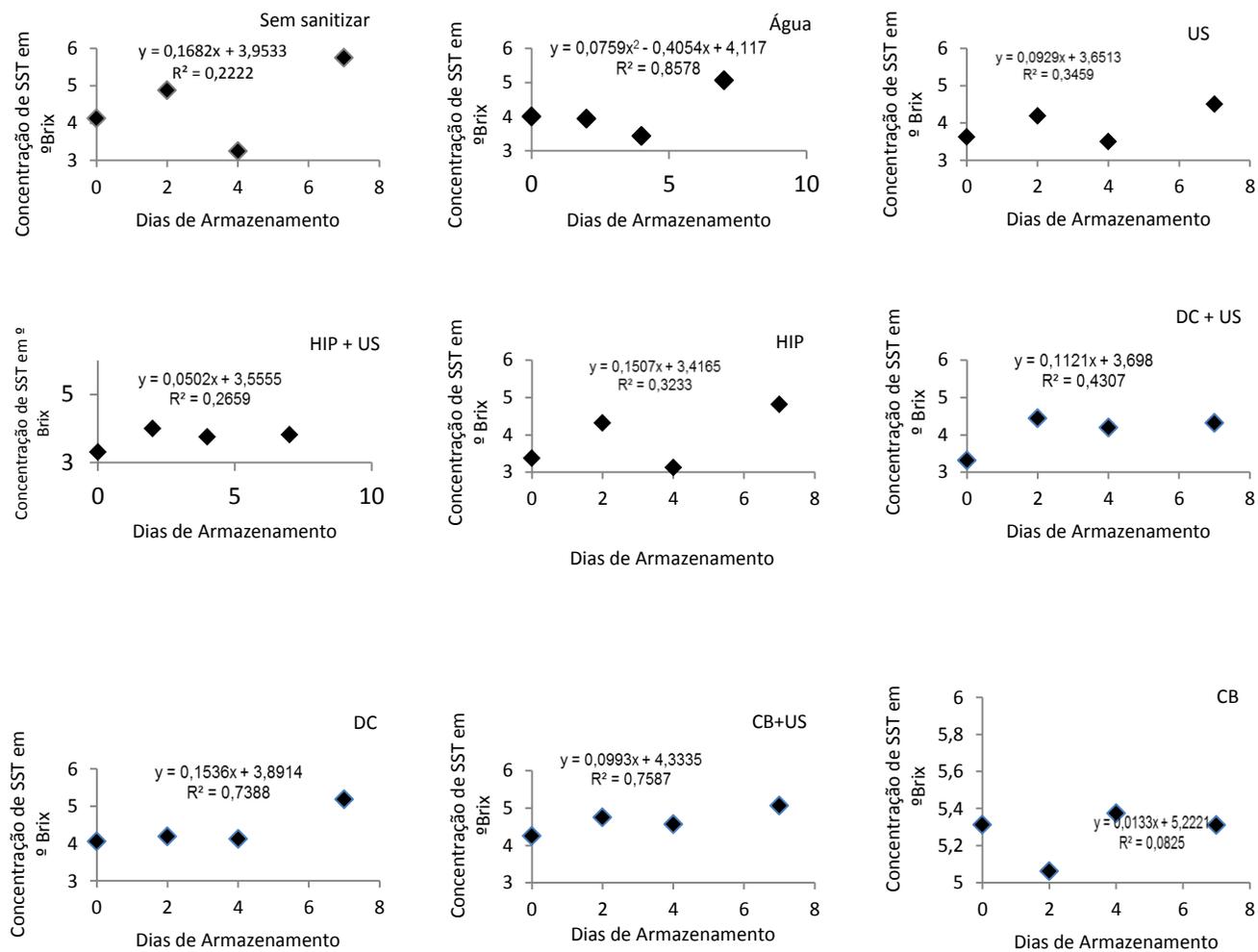


Figura 10: Comportamento da concentração de SST nas amostras de repolho roxo em função do tempo de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C.

A respiração dos vegetais utiliza os SST como fonte de energia, e estes podem ser utilizados também como substrato para multiplicação microbiana, sendo comum um decréscimo dos valores de SST com o tempo de armazenamento (ROSÁRIO, 2016). Porém, o aumento nos valores de SST nas amostras de repolho roxo, apresentado por alguns sanitizantes, após o 4º dia, pode estar relacionado à perda de massa durante o armazenamento e conseqüente concentração deste componente.

Rinald e colaboradores 2005, não observaram diferença no comportamento de SST, em repolhos minimamente processados tratados com hipoclorito, armazenados sobre refrigeração, em diferentes embalagens até o nono dia de armazenamento. A média inicial de SST em ° Brix foi de 4,9, ocorrendo uma redução destes valores após o nono dia de armazenamento. Segundo esses autores, a redução dos sólidos solúveis está ligada ao aumento da taxa respiratória do produto, que fez com que utilizasse as reservas existentes na célula.

#### **4.4 Efeito do dicloroisocianurato de sódio isolado e combinado ao ultrassom sobre a remoção de células de *Salmonella enterica* Typhimurium aderidas em superfície de repolho roxo.**

Os dados de redução da microbiota do repolho roxo, estudados anteriormente, mostraram que os procedimentos de sanitização utilizando cloreto de benzalcônio, tanto isoladamente, quanto combinados ao ultrassom, apresentaram reduções satisfatórias. Entretanto, a análises dos parâmetros físico-químicos mostraram que este mesmo sanitizante alterou negativamente as características físico-químicas do repolho roxo, ao longo do tempo de armazenamento de 7 dias a  $8 \pm 1$  °C, principalmente o componente nutricional antocianina. As injúrias provocadas após a aplicação dos sanitizantes utilizando cloreto de benzalcônio foram observadas desde o primeiro dia de armazenagem, com o passar dos dias de armazenamento as amostras apresentavam podridão e odor desagradável.

A integridade das características físico-químicas, sensoriais e nutricionais é de suma importância para qualidade do alimento e principalmente na aceitação do produto pelo consumidor. Sendo assim, foram selecionados para o teste desafio da *Salmonella* os tratamentos controle (sem sanitizar e água destilada) e o dicloroisocianurato de sódio isolado e combinado ao ultrassom.

A contagem de células de *S. enterica* Typhimurium inicial foi de 7,83 log de

UFC.g<sup>-1</sup> ou 5,93 log de UFC.cm<sup>-2</sup> de repolho roxo. Estudos realizados por Ells e Hansen (2006), Patel e Sharma (2010) e Elhariry (2011) mostraram que as características da superfície de repolhos tanto intactos quanto cortados colaboram para a adesão de células de patógenos como *Listeria* spp., *Bacillus cereus* e de diversos sorotipos de *Salmonella enterica*, sendo assim, pode ocorrer uma possível formação de biofilmes, condição que dificulta a ação de sanitizantes.

As contagens das células aderidas, inicialmente nas amostras de repolho roxo, neste estudo, evidenciam a possibilidade de formação de um biofilme microbiano ao longo do tempo.

As reduções na contagem de *S. Typhimurium* encontradas após a aplicação dos tratamentos ficaram entre 1,76 a 3,86 de log de UFC.g<sup>-1</sup> quando comparado ao tratamento controle, sem sanitizar (Tabela 10).

Tabela 10- Valores médios da contagem de *S. Typhimurium* aderidas em repolho roxo e redução decimal após os tratamentos

Tratamentos	Log UFC.g <sup>-1</sup>	Log UFC.cm <sup>-2</sup>	Redução Decimal
Sem Sanitizar	7,83 a	5,93 a	-
Água	6,08 b	4,17 b	1,76
DC	4,94 c	3,04 c	2,89
DC+US	3,97 d	2,07 d	3,86

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na mesma coluna não diferem entre si (p > 0,05) pelo teste de Duncan.

Foi observada diferença significativa (p <0,05) para todos os tratamentos aplicados. O ultrassom associado ao dicloroisocianurato de sódio apresentou melhor eficiência na remoção das células aderidas de *Salmonella Typhimurium* em relação aos demais tratamentos, alcançando redução de 3,86 log UFC.g<sup>-1</sup>. Alguns trabalhos utilizando ultrassom combinado a compostos clorados também encontraram reduções semelhantes na contagem células de patógenos aderidos em vegetais. Seymour et al. (2002) ao utilizarem o tratamento de ultrassom combinado a 100 mg.L<sup>-1</sup> de água clorada alcançaram uma redução de 2,7 log UFC.g<sup>-1</sup> em células de *S. Typhimurium* em alface. Huang e colaboradores (2006) utilizando ultrassom 170 kHz juntamente ao dióxido de cloro 20 mg.L<sup>-1</sup> encontraram uma redução de até 4 log UFC.g<sup>-1</sup> em células de *Salmonella* e *E. coli* O157: H7 aderidas em maçãs.

O ultrassom aumentou o número de reduções decimais do composto clorado

em um ciclo log, diferindo significativamente desse tratamento ( $p < 0,05$ ). Rosário (2016) também observou que o ultrassom (40 kHz/5 min) melhorou a ação do ácido peracético ( $40 \text{ mg.L}^{-1}$ ) na remoção de *Salmonella enterica* aderida em superfície de morangos. Este resultado pode ser explicado pelo mecanismo de ação do ultrassom. No processo de cavitação, ocorre implosão das bolhas, o que aumenta a pressão local e facilita a ação de agentes oxidantes, sobre as células dos patógenos, em locais de difícil acesso como camadas hidrofóbicas, dobras e ranhuras encontradas em superfície de frutas e hortaliças, o que resulta em uma melhor sanitização (GOGATE E KABATI, 2009; BILEK e TURANTAS, 2013; SAGONG et. al., 2014; SÃO JOSÉ, 2014).

Para observar a adesão das células de *S. Typhimurium* à superfície de repolho roxo foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A observação microscópica, por MEV, dos cortes de repolho roxo inoculados com células de *Salmonella Typhimurium* por 30 minutos indicou a presença de adesão celular à superfície do vegetal. A Figura 11 apresenta a adesão das células de *Salmonella Typhimurium* em cortes da superfície de repolhos roxos não expostos à sanitização (tratamento controle, sem sanitizar) e após os tratamentos com água, DC e DC+US.

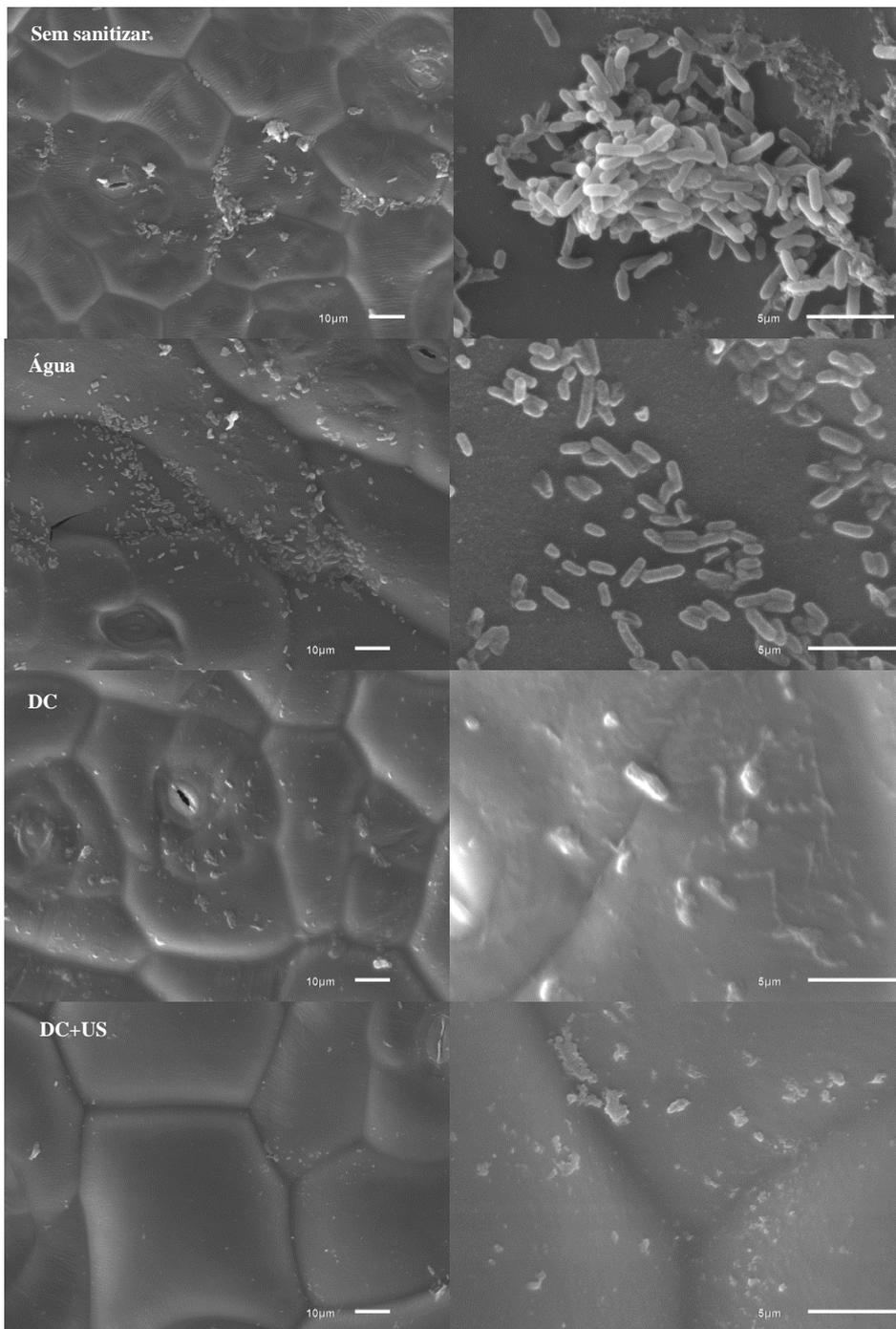


Figura 11 - Fotomicrografia Eletrônica dos cortes de repolho roxo e seus respectivos tratamentos: sem sanitizar (controle), água, dicloroisocianurato de sódio (DC) e dicloroisocianurato de sódio combinado ao ultrassom (DC+US).

Ainda não compreende-se completamente, como se dá o mecanismo de adesão microbiana, sugere-se que interações hidrofóbicas entre a camada da epiderme e os microrganismos colaboram para a adesão em cutículas rompidas, estômatos, lenticelas e tricomas dos vegetais (BURNETT e BEUCHAT, 2001; SEYMOUR et al., 2002).

A adesão de *Salmonella* na superfície de alimentos dificulta a ação do sanitizante. A inativação microbiana pode não ser completa, pois patógenos possuem capacidade de se aderir fortemente à epiderme de folhas reduzindo a eficiência dos tratamentos de sanitização (ALLENDE et al., 2008b). É possível observar (Figura 11) que as características da superfície do repolho roxo, colaboram para a adesão das células *Salmonella* Typhimuirum. As células apresentam-se aderidas e agrupadas, principalmente nas rugosidades da superfície das folhas do repolho, local que confere maior proteção à ação de agentes sanitizantes.

As imagens obtidas por MEV comprovam os resultados apresentados pela técnica de contagem padrão em placa em que a maior redução foi observada para o tratamento DC+US. O dicloroisocianurato de sódio quando utilizado isoladamente apresentou uma redução considerável, porém, muitas células ainda apresentaram-se aderidas à superfície celular. A MEV comprovou, também, o resultado apresentado pela técnica de contagem padrão em placas realizado no repolho tratado com dicloroisocianurato de sódio combinado ao ultrassom. O ultrassom foi capaz de causar a lise das células de *S. Typhimurium*, apresentando uma redução satisfatória, comprovando também o seu mecanismo de ação (Figura 11).

São José (2009), avaliou efeito do ultrassom combinado a 40 mg.L<sup>-1</sup> ácido peracético em *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 aderida à superfície de tomate cereja e observou uma redução de quase 4 log UFC.g<sup>-1</sup>. Huang et al. (2006) observaram uma maior redução na população contaminante de vegetais quando tratados por compostos químicos combinados ao ultrassom. Segundo Gogate e Kabadi (2009) quando o ultrassom é empregado associado a agentes químicos pode-se potencializar a eficiência dos sanitizantes.

A controvérsia atribuída ao excelente resultado do ultrassom combinado ao composto clorado nesta fase, de adesão de *Salmonella*, e o os resultados do seu efeito isolado e combinado aos demais agentes químicos, utilizados na primeira parte do trabalho, para redução da microbiota do repolho roxo, pode estar associada ao volume de amostras de repolho adicionadas ao aparelho de ultrassom. Na primeira

fase utilizou-se 500g de repolho roxo fatiado para 4 litros de solução no ultrassom, o que pode ter dificultado a propagação das ondas ultrassônicas, já na adesão de *S. Typhimurium* foram utilizadas aproximadamente 30 g de repolho para 1 litro de solução. Assim, torna-se importante observar uma proporção satisfatória de hortaliça e solução sanitizante.

O resultado da contagem de células de *S. Typhimurium* e de Unidades Relativas de Luz (URL), nas soluções, após os tratamentos, estão representados na Tabela 11.

É importante que se avalie a presença de *S. Typhimurium* também nas soluções dos tratamentos utilizados, após a sanitização, pois assim pode-se avaliar se o sanitizante foi capaz de inativar as células dos patógenos ou apenas remove-las da superfície do vegetal. Outro fator relevante é a possibilidade das células que só foram removidas, e não inativadas, contribuírem para ocorrência de contaminação cruzada após a sanitização, principalmente quando a água de lavagem ou sanitização é reutilizada em algum momento na indústria de alimentos.

Tabela 11 - Valores médios e desvio-padrão da contagem de *S. Typhimurium* e de URL nas soluções após os tratamentos por 5 minutos.

Tratamentos	Log UFC.mL <sup>-1</sup>	Log URL
Água	5,57 ± 0,15	3,59 ± 0,19 a
DC	n.d.	1,37 ± 0,17 b
DC+US	n.d.	1,56 ± 0,21 b

n.d: não detectado na menor diluição plaqueada (10<sup>0</sup>); Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na mesma coluna não diferem entre si (p > 0,05) pelo teste de Duncan.

A água, mesmo reduzindo 1,76 log de UFC.g<sup>-1</sup> nas amostras de repolho roxo inoculadas com células de *S. Typhimurium*, permitiu uma sobrevivência desses patógenos nas soluções com contagem de 5,57 log de UFC.mL<sup>-1</sup>. Comprovando que foi eficiente somente na remoção das células da superfície do repolho roxo e não na sua inativação. O que já era esperado, pois a água não é um sanitizante.

Os tratamentos utilizando dicloroisocianurato de sódio isolado ou combinado ao ultrassom se destacaram, reduzindo mais que 7,83 log UFC.mL<sup>-1</sup> nas contagens de *S. Typhimurium*, quando comparadas ao controle (sem sanitizar), não apresentando

crescimento de colônias na menor diluição ( $10^0$ ). A sobrevivência de células de patógenos em soluções de sanitização é preocupante para indústria de alimentos, uma vez que microrganismos patogênicos podem sobreviver por um longo período em meio líquido (GIL et al., 2009). Portanto é essencial que se tenha um controle maior da qualidade da água utilizada após a limpeza/sanitização e no processamento de frutas e hortaliças bem como seu lançamento no meio ambiente.

Outra técnica qualitativa, prática e rápida para avaliar a condição higiênica após sanitização de superfícies e água é a técnica de bioluminescência. Esse método se baseia na detecção de ATP (adenosina trifosfato) microbiano e de substâncias orgânicas encontradas na amostra. A reação ocorre através do ATP, se presente, com um complexo enzima-substrato chamado de luciferina-luciferase. A reação tem como resultado a formação de luz, mensurada pelo luminômetro em unidades relativas de luz (URL). Assim, quanto mais unidades relativas de luz presentes maiores a contagem microbiana ou de substâncias orgânicas em uma amostra de água ou superfície (CUNHA et. al., 2013).

Ao analisar os resultados das soluções sanitizantes em unidades relativas de luz (Tabela 11), confirmam-se os resultados encontrados pela técnica de contagem padrão em placas. Os valores de URL observados para as soluções dos tratamentos DC e DC+US podem estar associadas às células dos vegetais, uma vez que pela técnica de contagem em placa não foi detectada a presença de células de *S. Typhimurium* nessas soluções.

#### **4.5 Efeito da sanitização sobre as características sensoriais das amostras de repolho roxo**

Para análise sensorial, os tratamentos utilizando dicloroisocianurato de sódio, tanto isoladamente quanto combinado ao ultrassom, foram os escolhidos. Estes tratamentos obtiveram bons resultados, tanto na manutenção das características físico-químicas das amostras de repolho roxo, quanto nas reduções microbiológicas. O tratamento controle foi constituído de amostras tratadas apenas com água.

O teste de comparação múltipla foi realizado por 35 julgadores e estes não observaram diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos estudados, tanto para cor, quanto para textura.

Referindo-se à aceitação das amostras de repolho roxo tratadas com dicloroisocianurato de sódio combinado ou não ao ultrassom, os 72 julgadores que

participaram do teste não detectaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos aplicados às amostras. Ambos os tratamentos foram bem aceitos pelos consumidores, com notas médias de 7,72 para DC+US, 7,47 para o tratamento controle com água e 7,33 para o DC isoladamente, enquadrando-os entre os termos hedônicos gostei muito e gostei moderadamente.

Estes resultados são considerados positivos, uma vez que os tratamentos utilizados não alteram cor e textura de forma perceptível pelos avaliadores e também se mostraram bem aceitos pelos consumidores.

## 5 CONCLUSÃO

Apesar do surfactante cloreto de benzalcônio ter apresentado os melhores resultados na remoção da microbiota do repolho roxo, tanto isoladamente quando combinado ao ultrassom, não foi capaz de manter a integridade físico-química e nutricional do repolho roxo.

O dicloroisocianurato de sódio, dentre os sanitizantes utilizados, foi capaz de reduzir positivamente a microbiota do repolho roxo sem agredi-lo tanto no parâmetro nutricional quanto no físico-químico e sensorial.

O ultrassom promoveu a redução da contagem da microbiota do repolho roxo estatisticamente igual à obtida pelos compostos clorados. Na remoção de células de *Salmonella* aderidas ao repolho roxo o ultrassom melhorou o efeito do composto clorado orgânico e não alterou as características físico-químicas (ATT, perda de massa, cor, SST), nutricional (antocianinas) e sensorial do repolho roxo.

Desse modo, sugere-se o ultrassom como alternativa na redução da microbiota deterioradora de repolho roxo ou para melhorar o efeito de compostos clorados na remoção de patógenos da superfície dessa hortaliça preservando suas características físico-químicas, nutricionais e sensoriais.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 121–129, 2008.
- ABULREESH, H. H., in ANNOUS B. A., J.B. GURTLER. *Salmonella* - distribution, adaptation, control measures and molecular technologies. **Salmonellae in the environment**, p. 19–50, 2012.
- ADAY, M. S., CANER. C. Individual and combined effects of ultrasound, ozone and chlorinedioxide on strawberry storage life. **LWT - Food Science and Technology**. v. 57, n. 1, p. 344-351, 2014.
- ADEKUNTE, A.O.; TIWARI, B.K.; CULLEN, P.J.; SCANNELL, A.G.M.; O'DONNELL, C.P. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 500-507, 2010b.
- ADEKUNTE, A.; TIWARI, B.K.; SCANNELL, A.; CULLEN, P.J.; O'DONNELL, C. Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 116-120, 2010a.
- ALLENDE, A. SELMA, M.V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; GIL, M.I. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 2514-2518, 2008b.
- ALLENDE, A.; McEVOY, J. Y.; LUO, Y. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 230-234, 2008a.
- ALVARO, J. E.; MORENO, S.; DIANEZ, F.; SANTOS, M.; CARRASCO, G.; URRESTARAZU, M. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 1, p. 11-15, 2009.
- ANDRADE, N.J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. São Paulo, Varela, 2008.
- ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETTI, B. C.; SOUZA FILHO, M. S. M.; BORGES, M. F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'Pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 157-160, 2005.

AQUINO, A. C. M. de S., MÓES, R. S., CASTRO, A. A. Estabilidade de ácido ascórbico, carotenoides e antocianinas de frutos de acerola congelados por métodos criogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 154-163, 2011.

ARTÉS, F.; ALLENDE, A. Minimal fresh processing of vegetables, fruits and juices. In: D.W., Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing*. California: **Elsevier Academic Press Books**, p. 677-716, 2005.

ARZENI, C.; MARTINEZ, K.; ZEMA, P.; ARIAS, A.; PEREZ, O.; PILOSOF, A. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 463–472, 2012.

AWAD, T. S.; MOHARRAM, H. A.; SHALTOUT, O. E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M. M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 410 - 427, 2012.

BARTZ, J. A.; YUKE, H. G.; MAHOVICC, M. J.; WARREND, B. R.; SREEDHARANA, A.; SCHNEIDERA, K. R. Internalization of *Salmonella enterica* by tomato fruit. **Food Control**, v. 55, p. 141–150, 2015.

BILEK, S. E.; TURANTAS, F. Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 155-162, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Portaria nº 2914 de 14 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**. Brasília. DF. 14 dez. 2011.

BURNETT, S. L.; BEUCHAT, L. R. Food-borne pathogens: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p.104-110, 2001.

CAO, G.; BOOTH, S. L.; SADOWSKI, J. A.; PRIOR, R. L.; “Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and

vegetables”; **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 5, p. 1081, 1998.

CAO, S.; HU, Z.; PANG, B.; WANG, H.; XIE, H.; WU, F. Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 529-532, 2010.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC and Food Safety. 2015c. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>. Acesso: em 13 dez 2015.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations. 2015d. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>. Acesso: em 13 dez 2015.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Recall & Advice to Consumers. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/advice-consumers.html>. Acesso: em 13 dez 2015.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O121 Infections Linked to Raw Clover Sprouts. 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O121-05-14/index.html>. Acesso: em 13 dez 2015.

CEASA, Central Estadual de Abastecimento S/A. Disponível em: <<http://www.ceasa.es.gov.br/default.asp>>. Acesso em: 31 de maio de 2016.

CHABBA, S.; KUMAR, S.; ASWAL, V. K.; KANG, T. S.; MAHAJAN, R. K. Interfacial and aggregation behavior of aqueous mixtures of imidazolium based surface active ionic liquids and anionic surfactant sodium dodecylbenzenesulfonate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 472, p. 9–20, 2015.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing - food quality assurance and food safety. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 2, p. 88–98, 2012.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHEN, Y.; WANG, H.; XU, Y.; WU, J.; XIAO, G. Effect of treatment with dimethyl dicarbonate on microorganisms and quality of Chinese cabbage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 76, p. 139-144, 2013.

CHEN, Z.; ZHU, C. Combined effects of aqueous chlorine dioxide and ultrasonic treatments on postharvest storage quality of plum fruit (*Prunus salicina* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 061, n. 2-3, p. 117-123, 2011.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras, MG, 2 Ed. Revê ampl. 785 p. 2005.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 915-929, 2002.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Produção e qualidade de frutos diferentes cultivares de morangueiro em ensaios conduzidos em Atibaia e Piracicaba. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 9, p. 2581-2598, 2002.

CRUZ, C. D. Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. VIÇOSA, MG: EDITORA UFV, v. 1, p.442 1997.

CUNHA, A. F.; LAGE, A. D.; PEREIRA e ARAÚJO, M. M.; SANTOS, R. D. P.; RESENDE, G. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Avaliação da qualidade microbiológica de bebida láctea e creme de leite UAT por ATP-Bioluminescência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 595-600, 2013.

DANTAS, R. L. Perfil da qualidade de polpas de fruta comercializadas na cidade de Campina Grande/PB. **Revista Verde**, v. 5, n. 5, p. 61 - 66, 2010.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de Varredura**: Aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 60, 2007.

DEMIRDÖVEN, A.; BAYSAL, T. The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. **Food Reviews International**, v. 25, n. 1, p. 1–11. 2008.

DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association - APHA, 2001.

DRAKOPOULOU, S.; TERZAKIS, S.; FOUNTOULAKIS, M. S.; MANTZAVINOS, D.; MANIOS, T. Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive

bacteria in secondary treated municipal wastewater. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 16, n. 5, p. 629-634, 2009.

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. 3.ed. Curitiba: Champagnat, p. 426, 2011.

EIBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J.; Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n.1, p. 23, 2004.

ELHARIRY, H. M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1266-1274, 2011.

ELLS, T. C.; HANSEN, L. T. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 34-42, 2006.

EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Repolho**. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/hortalicasnaweb/repolho.html>>. Acesso em: 05 de julho de 2016.

EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Repolho**. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/hortalicasnaweb/repolho.html>>. Acesso em: 1 de outubro de 2015.

FANTUZZI E. , PUSCHMANN, R., VANETTI M. C. D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 207-211, 2004.

FARAONI A. S.; RAMOS A. M.; STRINGHETA P. C. Caracterização de manga orgânica cultivar Ubá. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2009.

FAVARO, A. M. M. **Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2007.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 602, 2006.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Ultrasound as pre-treatment for drying of

fruits: Dehydration of banana. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 2, p. 261-267, 2007.

FERREIRA, S. M. R.; QUADROS, D. A.; KARKLE, E. N. L.; LIMA, J. J.; TULLIO, L. T.; PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H, G. G.; CÂNDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H. S.; AMELIN, I. M. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba - SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 50-55, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Potential for Infiltration, Survival, and Growth of Human Pathogens within Fruits and Vegetables**, 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/HACCP/ucm082063.htm>>. Acesso: 21 nov. 2015.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins in foods. In: Markakis, P. Anthocyanins as food colors. **New York: Academic Press**, p. 181-207, 1982.

FRANK J.F, TAKEUSH K. Direct observation of *E. coli* O157:H7 inactivation on lettuce leaf using confocal scanning laser microscopy. In: **Proceedings of International Conference of International Committee on Food Microbiology and Hygiene**. Veldhoven, p. 795- 797, 1999.

FREITAS, C. A. S de; MAIA G. A.; COSTA J. M. C. da; FIGUEIREDO, R. W. de; SOUSA, P. H. M. de; FERNANDES, A. G. Estabilidade dos carotenoides, antocianinas e vitamina c presentes no suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) adoçado envasado pelos processos hot-fill e asséptico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 942-949, 2006.

FRODER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas**. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2005.

GIL, M. I.; SELMA, M. V.; LÓPEZ-GALVEZ, F.; ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 134, n. 1-2, p. 37-45, 2009.

GIL, M. I.; SELMA, M. V.; LÓPEZ-GALVEZ, F.; ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n.1-2, p. 37-45, 2009.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of application of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 44, n. 1, p.60 - 72, 2009.

GRAÇA, A.; ABADIAS, M.; SALAZAR, M.; NUNES, C. The use of electrolyzed water as a disinfectant for minimally processed apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, n. 2–3, p. 172–177, 2011.

GUERRERO, S.; LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S. M. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 2, n. 1, p. 31-39, 2001.

GUERZONI, M. A.; GIANOTTI, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA M. Shelf – life modelling for fresh-cut vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 1, p. 59-73, 2002.

HEATON, J. C.; JONES, K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n. 3, p. 613–626, 2008.

HU, B.; CHEN, X.; ZUO, Y.; LIU, Z.; XING, X. Dual action bactericides: Quaternary ammonium/N-halamine-functionalized cellulose fiber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 7, 2014.

HUANG, Y.; XU, C. L.; WALKER, K.; WEST, P.; ZHANG, S.Q.; WEESE, J. Decontamination efficacy of combined chloride dioxide with ultrasonication on apple and lettuce. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. 134-139, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4ª ed. Brasília, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: Coordenadoria dos Serviços Técnicos especializados – Secretaria do Estado de Saúde, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KADER, A. A. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 40, n. 5, p. 99-104, 1986.

KLUGE, A. R.; NACHTIGAL J. C.; FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e**

**Manejo Pós-Colheita de Frutas de Clima Temperado.** Campinas: EditorA Rural, p. 214, 2002.

LANDGRAF, M. **Fundamentos e perspectivas da irradiação de alimentos visando ao aumento de sua segurança e qualidade microbiológica.** Tese de Livre-Docência (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LOPES, T. J.; QUADRI, M. B.; QUADRI, M. G. N. Estudo experimental da adsorção de antocianinas comercial de Repolho-roxo em argilas no processo de batelada. **Brazilian Journal of Food Techonology**, v. 9, p. 49-56, 2006.

LUO, K.; OH, D. H. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh-cut bell pepper treated with slightly acidic electrolyzed water combined with ultrasound and mild heat. **Food Microbiology**, v. 53, p. 154-171, 2016.

LUO, K.; KIM, S. Y.; WANG, J.; OH, D-H. A combined hurdle approach of slightly acidic electrolyzed water simultaneous with ultrasound to inactivate *Bacillus cereus* on potato. **Food Science and Technology**, v. 73, p. 615-621, 2016.

LUTEY, R. W. Process cooling water. In: Hand book of biocides and preservative. Use ed. Rossmore, H. W. **Blackie Academic and Professional**, p. 50-82, London, 1995.

MACÊDO, J. A. B.; ANDRADE, N. J.; ARAÚJO, J. M. A. A.; CHAVES, J. B. P.; SILVA, M. T. C.; JORDÃO, C. P. Cloraminas orgânicas uma solução para evitar a formação de trihalometanos no processo de desinfecção de águas para o abastecimento público. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 90 e 91, p. 93–103, 2001.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2005.

MALLACRIDA S. R.; MOTTA S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 24, p. 59-82, 2006.

MASON, T.; RIERA, E.; VERCET, A.; LOPEZ-BUESA, P. Application of ultrasound. In: Sun, D.W. Editor, Emerging technologies for food processing. **Elsevier Academic Press Book**, California, p. 323–350, 2005.

MERCOSUL/GMC. **Grupo Mercado Comum. Resolução nº 28 de 20 de julho de**

2002. Regulamento técnico Mercosul para: produtos de ação antimicrobiana. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 28 de março, 2015.

MORETTI, C. V. Encontro Nacional sobre processamento mínimo de frutas e frutas e hortaliças, Lavras, 2008.

MORRIS, C. E.; MONIER, J. M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 429 - 453, 2003.

MUNKACSI, F.; ELHAMI, M. Effect of ultrasonic and ultraviolet irradiation on chemical and bacteriological quality of milk. **Egyptian Journal of Dairy Science**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1976.

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos socioeconômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em Pauta**, v. 40, p. 22-26, 2000.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N. Tratamentos químicos de sanitização de morango (*Fragaria vesca* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.13, n.1, p. 11-17, 2010.

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

OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, n.8, p.1400–1403, 2011.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p.686-693, 2009.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRET, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to reduce/eliminate pathogens form fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p. 161-173, 2003.

PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1, p. 41-47, 2010.

PATHARE, P. B., OPARA, U. L., AL-SAID, F. A. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 36-40, 2013.

PAVÓN, J. L. P.; MARTÍN, S. H.; PINTO, C. G.; CORDER, B. M. Determination of trihalomethanes in water samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.629, n.1-2, p. 6-23, 2008.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; McKELLAR, R.C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 207-216, 2003.

PRADO, S. P. T; RIBEIRO, E. G. A.; CAPUANO, D. M.; AQUINO, A. L.; ROCHA, G. M.; BERGAMINI, A. M.M. Avaliação microbiológica, parasitológica e da rotulagem de hortaliças minimamente processadas comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 221-227, 2008.

RAHMAN, S. M. E.; JIN, Y-G.; OH, D-H. Combination treatment of alkaline electrolyzed water and citric acid with mild heat to ensure microbial safety, shelf life and sensory quality of shredded carrots. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 484-491, 2011.

RAIDEN, R.M. **Efficacy of detergent rinse agents to remove *Salmonella* and *Shigella* spp. from the surface of fresh produce.** (Master of Science in Food Science and Technology). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2002.

REIS, R. C.; MINIM, V. P. R. Testes de aceitação. In: MINIM, V. P. R. (Ed.). **Análise sensorial: estudos com consumidores.** 2ª ed. Viçosa: Editora UFV, p. 66-82, 2010.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J.; Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n.8, p. 1228, 2006.

RICO, D. ; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, n.7, p.373-386, 2007.

RINALDI, M. M.; BENEDETTI, B. C.; CALORE, L. Efeito da embalagem e temperatura de armazenamento em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de**

**Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 480-486, 2005.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. T. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p.518-521, 2009.

ROSA, C. C. B.; MARTINS, M. L. L. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das hortaliças de hortas comunitárias de Campos dos Goytacazes – RJ. In: **congresso brasileiro de microbiologia**. Londrina: SBM, v. 21, p. 404, 2001.

ROSARIO, D. K. A. **Efeitos isolados e combinados de ultrassom e de compostos químicos em morangos (*Fragaria x ananassa duch.*)**. 80f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

RUÍZ-CRUZ, S.; FÉLIX, E. A.; CINCO, M. D.; OSUNA, M. A. I.; AGUILAR, G. A. G. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. **Food Control**, v. 18, n. 11, p.1383-1390, 2007.

RYAN-BARRY, C. MARTÍN-DIANA, A. B.; RICO, D. Green tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 593-603, 2008.

SAGONG, H.; CHEON, H.; KIM, S.; LEE, S.; PARK, K.; CHUNG, M.; CHOI, Y.; KANG, D. Combined effects of ultrasound and surfactants to reduce *Bacillus cereus* spores on lettuce and carrots. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 367–372, 2013.

SAGONG, H.; LEE, S.; CHANG, P.; HEU, S.; RYU, S.; CHOI, Y.; KANG, D. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 287-292, 2011.

SAN MARTÍN, M. F.; HARTE, F. M.; LELIEVELD, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; SWANSON, B.G. Inactivation effect of 18-Tpulsed magnetic field combined with another technologies on *Escherichia coli*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 2, n. 1, p. 273-277, 2001.

SANGO, D. M.; ABELA, D.; MCELHATTON, A.; VALDRAMIDIS, V. P. Assisted ultrasound applications for the production of safe foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, n. 5, p. 1067-1083, 2014.

SÃO JOSÉ, J. F. B., ANDRADE, N. J., RAMOS, A. M., VANETTI, M. C. D., STRINGHETA, P.C., CHAVES, J. B. P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, v. 35, p. 36-50. 2014.

SÃO JOSE, J. F. B. **Caracterização físico-química e microbiológica de tomate cereja (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*) minimamente processado submetido a diferentes tratamentos de sanitização.** 141f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; VANETTI, M. C. D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v. 24, p. 95-99, 2012.

SÃO JOSÉ, J. F. B. **Sanitização por ultrassom e agentes químicos no processamento mínimo de hortaliças.** 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SELMA, M. V.; IBANEZA, A. M.; ALLENDE, A.; CANTWELLA, M.; SUSLOW, T. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. **Food Microbiology**, v. 25, n.1, p. 162-168, 2008.

SEYMOUR, I. J. ; BURFOOT, D.; SMITH, R. L.; COX, L. A.; LOCKWOOD, A. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n.1, p. 547-557, 2002.

SHEN, C.; LUO, Y.; NAN, X.; BAUCHAN, G.; ZHOU, B.; WANG, Q.; MILNER, P. Enhanced inactivation of *Salmonella* and *Pseudomonas* biofilms on stainless steel by use of T-128, a fresh produce washing aid in chlorinated wash solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n.19, p. 6789-98, 2012.

SILVA, A. V. C., OLIVEIRA, D. S. N., YAGUIU, P., CARNELOSSI, M. A. G., MUNIZ, E. N., NARAIN, N. Temperatura e embalagem para abóbora minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 391-394, 2009.

SILVA, M. L. C., COSTA, R. S., SANTANA, S. A., KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R.

F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010.

SORIA, A.C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, n.7, p. 323-331, 2010.

TAN, S. Y.; KRAJNIK, M. M.; NEO, S. Y.; TAN, A.; KHOO, G. H.; YUK, H. G. Effectiveness of various sanitizer treatments for inactivating natural microflora and *Salmonella* spp. on turnip (*Pachyrhizus erosus*). **Food Control**, v. 54, p. 216-224, 2015.

TIVELLI, S. W.; PURQUEIRO, L. F. V.; KANO, C. Adubação verde e plantio direto em hortaliças. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 7, p. 1-8, 2010.

TIWARI, B. K.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN P. J.; O'DONNELL, C. P. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 3, p. 598-604, 2010.

TORNUK, F.; CANKURT, H.; OZTURK, I.; SAGDIC, O.; BAYRAM O.; YETIM, H. Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. **International Journal of Food Microbiology**, v.148, n.1, p.30-35, 2011.

VEIGA, S. M. O. M. **Sanificação de carcaças de frango: processos alternativos**. 291 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

WOODS, C.W. **Examination of the effects of biosurfactant concentration on natural gas hydrate formation in seafloor porous media**. 141f. Thesis. (Dave C. Swalm School of Chemical Engineering). Mississippi State University, 2004.

ZENKER, M.; HEINZ, V.; KNORR, D. Application of ultrasound assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1642-1649, 2003.

ZERDAS, E. M. A., **Avaliação do uso de surfactantes na remoção de *Salmonella enteritidis* aderida em superfície foliar da alface (*Lactuca sativa* L.)**. 58f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial Biofilms in the Food Processing Industry:

Should They Be a Concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.

## APÊNDICE

### APENDICE A- Fichas de avaliação sensorial

#### Teste de diferença de Comparação Múltipla

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Você receberá amostras de repolho roxo para serem comparadas quanto à cor e textura. As amostras deverão ser comparadas com a amostra referência, marcada com a letra R. Por favor, analise-as e determine se elas são maiores que R, iguais a R ou menores que R. Em seguida, classifique o tamanho dessa diferença.

#### Cor:

<b>Diferença:</b>	Código:	Código:	Código:
Maior que R	-----	-----	-----
Igual a R	-----	-----	-----
Menor que R	-----	-----	-----
<b>Intensidade da diferença:</b>			
Nenhuma	-----	-----	-----
Pequena	-----	-----	-----
Moderada	-----	-----	-----
Grande	-----	-----	-----
Extrema	-----	-----	-----

#### Textura:

<b>Diferença:</b>	Código:	Código:	Código:
Maior que R	-----	-----	-----
Igual a R	-----	-----	-----
Menor que R	-----	-----	-----
<b>Intensidade da diferença:</b>			
Nenhuma	-----	-----	-----
Pequena	-----	-----	-----
Moderada	-----	-----	-----
Grande	-----	-----	-----
Extrema	-----	-----	-----

#### Teste de aceitação

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Por favor, avalie a amostra servida, VISUALMENTE, e indique o quanto você gostou ou desgostou de cada um dos atributos sensoriais do produto, dando notas de acordo com a escala abaixo.

Código da amostra \_\_\_\_\_ Cor \_\_\_\_\_ Textura \_\_\_\_\_ Impressão global \_\_\_\_\_

- 9- Gostei extremamente
  - 8- Gostei muito
  - 7- Gostei moderadamente
  - 6- Gostei ligeiramente
  - 5- Não gostei/nem desgostei
  - 4- Desgostei ligeiramente
  - 3- Desgostei moderadamente
  - 2- Desgostei muito
  - 1- desgostei extremamente
- Comentários \_\_\_\_\_

## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer Comitê de Ética

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeitos isolados e combinados do uso de compostos clorados, surfactante, nanopartícula de prata e ultrassom na sanitização de repolho roxo (Brassica oleracea var. Capitata).

**Pesquisador:** Patrícia Campos Bernardes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45237015.5.0000.5060

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.150.810

**Data da Relatoria:** 24/06/2015

##### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa orientado por Patrícia Campos Bernardes, professora lotada no Departamento de Engenharia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo.

**JUSTIFICATIVA:** A exigência por alimentos prontos para o consumo, de rápido preparo, nutritivos e com características próximas ao in natura é um grande desafio na indústria de alimentos. O repolho roxo é uma hortaliça bastante consumida no Brasil e possui compostos antioxidantes que agregam valor a esta hortaliça. Comumente seu consumo é "in natura", sem nenhum tratamento prévio. A etapa de sanitização dos alimentos é de grande importância para garantir a segurança dos alimentos consumidos crus. Entretanto, observa-se em métodos comuns de sanitização que a população microbiana é reduzida em, no máximo, dois ciclos logarítmicos. Assim, existe o interesse por compostos e ou tratamentos eficazes na eliminação de microrganismos, que possam conferir inocuidade desses alimentos sem alterar suas características nutricionais e sensoriais. O surgimento de novas técnicas e ou agentes de sanitização traz a necessidade de estudos que atestem a sua eficiência e o seu comportamento sobre o alimento.

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

Continuação do Parecer: 1.150.610

**OBJETIVO:** avaliar o efeito isolado e combinado do uso de diferentes compostos e ultrassom na redução da contaminação microbiológica do repolho roxo e sua influência nos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais. Os tratamentos que obtiverem melhor redução da população microbiana serão conduzidos para o teste desafio de Inativação de Salmonella Intencionalmente aderida a superfície do repolho roxo e para a análise sensorial visual de cor e textura.

**LOCAL DO ESTUDO:** Laboratório de Análise Sensorial do CCA/UFES.

**INTERVENÇÃO/PROCEDIMENTOS:** Nesta pesquisa, está prevista a participação de pessoas em sessões de Análise Sensorial do repolho roxo. Serão avaliados aspectos visuais de cor e textura dos tratamentos realizados no repolho com os compostos químicos e ultrassom que obtiveram melhores resultados. A análise será de caráter visual, pelo fato de ainda não haver estudos e legislação específica que assegurem toxicologicamente a ingestão de produtos processados com as nanopartículas de prata. Os testes serão realizados no laboratório de Análise Sensorial do CCA/UFES.

**BENEFÍCIOS:** Como benefício direto dessa pesquisa espera-se que o ultrassom potencialize o efeito dos sanitizantes na inativação dos possíveis microrganismos patogênicos e deterioradores que possam vir a contaminar o repolho roxo, garantido a sua segurança microbiológica e estendendo sua vida útil. Como benefício indireto espera-se que o ultrassom não altere as características físico-químicas e sensoriais visuais do repolho roxo. Assim, espera-se que possa ser definido um tratamento que aumente a vida útil do repolho e garanta a sua segurança microbiológica trazendo benefícios ao consumidor.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

avaliar os efeitos individuais e combinados do uso de diferentes compostos e do ultrassom em repolho roxo e suas influências nos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais durante o período de armazenamento.

**Objetivo Secundário:**

- Avaliar a ação de dois compostos clorados, um surfactante e da nanopartícula de prata associados ou não ao ultrassom na remoção/inativação da microbiota natural do repolho roxo;

Endereço: Av. Marechal Campos 1488  
Bairro: S/N CEP: 29.040-091  
UF: ES Município: VITORIA  
Telefone: (27)3335-7211 E-mail: ccep@cca.ufes.br

Continuação do Parecer: 1.150.810

- Avaliar a acidez titulável, pH, teor de sólidos solúveis, teor de vitamina C, teor de antocianina e cor do repolho roxo antes e após os tratamentos;
- Avaliar o efeito dos tratamentos sobre a qualidade microbiológica do repolho roxo durante o período de armazenamento;
- Avaliar o efeito dos tratamentos nas características físico-químicas, vitamina C e antocianinas do repolho roxo durante o período de armazenamento;
- Selecionar os tratamentos que obtiveram os melhores resultados na redução da carga microbiana, nas características físico-químicas e nutricionais do repolho, para avaliar a remoção/inativação da Salmonella aderida intencionalmente à superfície do repolho roxo
- Avaliar se os melhores tratamentos no repolho levaram a alterações sensoriais (visuais) perceptíveis pelos consumidores;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

- Riscos: de acordo com a pesquisadora, "Um possível risco seria causar cansaço ou desconforto aos julgadores. Para minimizar esse risco serão apresentadas apenas quatro amostras por sessão."
- Benefícios: de acordo com a pesquisadora, "Como benefício direto dessa pesquisa espera-se que o ultrassom potencialize o efeito dos sanitizantes na inativação dos possíveis microrganismos patogênicos e deterioradores que possam vir a contaminar o repolho roxo, garantido a sua segurança microbiológica e estendendo sua vida útil. Como benefício indireto espera-se que o ultrassom não altere as características físico-químicas e sensoriais visuais do repolho roxo. Assim, espera-se que possa ser definido um tratamento que aumente a vida útil do repolho e garanta a sua segurança microbiológica trazendo benefícios ao consumidor."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de pesquisa potencialmente relevante, com benefícios previstos prevalecendo sobre os riscos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- a folha de rosto está adequada
- o projeto de pesquisa está adequado
- o TCLE está adequado
- o orçamento é apresentado de forma adequada

**Recomendações:**

Antes de submeter ou ressubmeter seu projeto de pesquisa para o CEP verifique as recomendações abaixo:

Endereço: Av. Marechal Campos 1488  
Bairro: S/N CEP: 29.040-091  
UF: ES Município: VITORIA  
Telefone: (27)3335-7211 E-mail: cep@ccs.ufes.br