

JACKLINE FREITAS BRILHANTE DE SÃO JOSÉ

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE TOMATE  
CEREJA (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*) MINIMAMENTE  
PROCESSADO SUBMETIDO A DIFERENTES TRATAMENTOS DE  
SANITIZAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S239c  
2013

São José, Jackline Freitas Brilhante de, 1983-  
Caracterização físico-química e microbiológica de tomate  
cereja (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*)  
minimamente processado submetido a diferentes tratamentos  
de sanitização / Jackline Freitas Brilhante de São José. –  
Viçosa, MG, 2013.  
xiii, 141f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Nélio José de Andrade

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Hortaliças - Processamento.  
3. Hortaliças - Microbiologia. 4. Ultrassom. 5. Desinfecção e  
desinfetantes. 6. Alimentos – Qualidade. 7. Tecnologia de  
alimentos. 8. *Salmonella enterica*. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

JACKLINE FREITAS BRILHANTE DE SÃO JOSÉ

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE TOMATE  
CEREJA (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*) MINIMAMENTE  
PROCESSADO SUBMETIDO A DIFERENTES TRATAMENTOS DE  
SANITIZAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 18 de abril de 2013.

---

Prof. Afonso Mota Ramos  
(Coorientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Coorientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Patrícia Campos Bernardes

---

Prof. Wilmer Edgar Luera Peña

---

Prof. Nélio José de Andrade  
(Orientador)

*"O que vale na vida não é o ponto de partida, e sim a caminhada.  
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."  
(Cora Coralina)*

*A Deus,*

**AGRADEÇO**

*Aos meus pais, Maria da Conceição e José Antônio,*

*ao meu irmão Jackson,*

*e ao meu namorado Leonardo*

*pelo amor, dedicação, apoio e total incentivo.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai de infinita bondade, que permitiu que chegasse até aqui, iluminando meu caminho e me concedendo força para superar cada dificuldade;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade e pelo grandioso aprendizado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Professor Nélio José de Andrade, pela confiança, compreensão, incentivo, e principalmente pelo apoio e ensinamentos;

Ao Professor Afonso Mota Ramos e a Professora Maria Cristina Danta Vanetti, pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção fornecidos;

Ao Professor Wilmer Edgar e a Professora Patrícia Campos Bernardes pela participação e contribuição na defesa;

Aos Professores Paulo Stringheta e José Benício Paes Chaves pela participação no projeto e na qualificação;

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos;

À professora Helena Maria Pinheiro Santana pela amizade e por permitir a realização das análises cromatográficas no Laboratório de Análises de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV;

Ao professor Sukarno, do Departamento de Física da UFV, por permitir a utilização do perfilômetro;

A Karla, Gilmar e Artur, funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela ajuda e sugestões no preparo das amostras para as análises microscópicas.

Aos meus pais, Maria da Conceição e José Antônio, pelo amor, apoio, incentivo e confiança em todos os momentos;

Ao meu querido irmão, Jackson, pelo apoio, incentivo e conselhos;

Ao meu namorado Leonardo pelo amor, dedicação, apoio e compreensão;

A todos meus familiares, pelo apoio e carinho;

Aos amigos do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, Hiasmyne, Patrícia Érica, João, Juninho, Evelyn, Mônica e Roberta pelo companheirismo, apoio e amizade;

Aos estagiários do laboratório Daniel, Lorena, Maíra, Camila, Eliara e Daiene pela ajuda nas várias etapas deste trabalho;

A Christiane Mileib pela amizade e ajuda nas análises estatísticas;

Às minhas amigas Débora, Daniela, Hatanne, Hudsara, Gardênia e Monise pelo apoio, incentivo, torcida e amizade;

Aos colegas de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela convivência agradável durante os anos de doutorado;

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a Geralda, Carla, Letícia, Pollyanna e Marcos, pela atenção;

Enfim, a todas as pessoas que se fizeram presentes, se preocuparam, torceram e, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

JACKLINE FREITAS BRILHANTE DE SÃO JOSÉ, filha de José Antônio Brilhante de São José e de Maria da Conceição Freitas de São José, nasceu em Viçosa, Minas Gerais no dia 26 de setembro de 1983.

Em maio de 2002 iniciou o curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa e colou grau em março de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, e defendeu a dissertação em julho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
1.Considerações gerais.....	3
2.Processamento mínimo.....	5
3. Sanitizantes usados na indústria de processamento mínimo.....	6
3.1. Ultrassom.....	9
3.2. Ácidos orgânicos.....	13
3.3. Surfactantes/Detergentes.....	15
3.4. Nanopartículas de prata.....	16
4.REFERÊNCIAS .....	20
<b>CAPÍTULO 2. Efeito do tratamento com ultrassom, detergente a base de tensoativos, ácido láctico e nanopartículas de prata na inativação de células de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis aderidas a superfície de tomate cereja.....</b>	<b>38</b>
RESUMO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. Amostras de tomate cereja.....	42
2.2. Avaliação da microbiota natural de tomate cereja.....	42
2.3. Caracterização da superfície do tomate cereja.....	44
2.4. Preparo dos sanitizantes.....	47
2.5. Avaliação da tensão interfacial e pH dos sanitizantes.....	47
2.6. Teste desafio dos procedimentos de sanitização: Avaliação da eficiência dos sanitizantes na remoção de células de <i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC 13076 .....	48
2.6.1. Preparo das amostras.....	49
2.6.2. Preparo do inóculo.....	49
2.6.3. Inoculação dos tomates cereja.....	49
2.6.4. Quantificação das células aderidas .....	50
2.6.5. Preparo dos cortes para observação microscópica.....	50
2.6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	51
2.6.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	52

2.6.8	Avaliação da presença de resíduos de prata na superfície de tomate cereja por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X.....	52
2.6.9	Avaliação da alteração das nanopartículas de prata após a aplicação em associação ao ultrassom por meio do raio hidrodinâmico e por microscopia eletrônica de transmissão.....	52
2.7	Análises estatísticas.....	53
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1	Avaliação da microbiota natural de tomate cereja.....	54
3.2	Caracterização da superfície do tomate cereja.....	55
3.2.1	Rugosidade da superfície.....	55
3.2.2	Hidrofobicidade qualitativa, energia livre de interação hidrofóbica e energia livre de adesão.....	56
3.3	Avaliação da tensão interfacial e pH dos sanitizantes .....	58
3.4	Avaliação do efeito dos tratamentos sanitizantes em <i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC 13076.....	60
3.4.1	Avaliação do efeito dos tratamentos sanitizantes em <i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC 13076 presente na solução após a sanitização.....	66
3.4.2	Avaliação do efeito dos tratamentos sanitizantes em <i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC 13076 por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	68
3.4.3	Avaliação das alterações na estrutura celular de <i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC 13076 por Microscopia Eletrônica de Transmissão....	73
3.4.4	Avaliação da presença de resíduos de prata na superfície de tomate cereja após a sanitização por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X .....	78
3.4.5	Avaliação da alteração das nanopartículas após o uso do ultrassom por meio da medida do raio hidrodinâmico e por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	80
4.	CONCLUSÕES.....	83
5.	REFERÊNCIAS .....	85

<b>CAPÍTULO 3 : Sanitização de tomate cereja por ultrassom, detergente a base de tensoativos, ácido láctico e nanopartículas de prata: efeitos na microbiota natural contaminante e nas características físico-químicas.....</b>	<b>96</b>
RESUMO.....	96
1.INTRODUÇÃO .....	98
2.MATERIAL E MÉTODOS .....	100
2.1.Análises Microbiológicas.....	100
2.1.1. Amostras de tomate cereja .....	100
2.1.2. Sanitização dos tomates cereja.....	100
2.2. Avaliação da microbiota natural de tomate cereja após a sanitização e ao final do período de armazenamento de 10 dias.....	102
2.2.1. Contagem de mesófilos aeróbios .....	102
2.2.2. Fungos filamentosos e leveduras .....	102
2.2.3. Coliformes a 35 °C .....	102
2.2.4. Psicrotróficos aeróbios .....	103
2.2.5. Bactérias lácticas.....	103
2.3. Análises físico-químicas.....	103
2.3.1. Acidez titulável .....	103
2.3.2. pH.....	103
2.3.3. Teor de sólidos solúveis .....	104
2.3.4. Cor instrumental.....	104
2.3.5. Firmeza.....	104
2.3.6. Extração e análise de ácido ascórbico .....	104
2.3.7. Extração e análise de carotenóides.....	105
3. Análise estatística.....	106
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
4.1. Análises microbiológicas .....	107
4.2. Análises físico-químicas .....	113
5. CONCLUSÕES .....	125
6. REFERÊNCIAS .....	126
APÊNDICES.....	133

## RESUMO

SÃO JOSÉ, Jackline Freitas Brilhante de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Caracterização físico-química e microbiológica de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) minimamente processado submetido a diferentes tratamentos de sanitização.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Afonso Mota Ramos e Maria Cristina Dantas Vanetti.

A sanitização é etapa essencial para contribuir para segurança e extensão da vida de prateleira de frutas e hortaliças. Este trabalho objetivou avaliar o efeito do tratamento com ultrassom (US), dicloroisocianurato de sódio (DCS), detergente a base de tensoativos (DET), ácido láctico (AL) e nanopartículas de prata (NP) na inativação de células de *Salmonella enterica* Enteritidis aderidas à superfície de tomate cereja e o efeito desses diferentes tratamentos de sanitização na microbiota natural contaminante e nas características físico-químicas de tomates cerejas armazenados a 7 °C por 10 dias. A avaliação da microbiota contaminante natural do tomate cereja indicou ausência de *Salmonella* sp. e contagem de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, bactérias lácticas, *Pseudomonas* sp., coliformes a 35 °C e psicrotróficos aeróbios iguais a 4,06, 4,30, 3,41, 2,78, 4,28, 2,99 log UFC·g<sup>-1</sup>, respectivamente. A rugosidade média da superfície do tomate cereja foi igual 2,66 µm o que indicou a presença de irregularidades na superfície da hortaliça que poderiam alojar micro-organismos. De acordo com as avaliações da hidrofobicidade qualitativa e quantitativa, a superfície de tomate cereja foi considerada hidrofóbica e *S. Enteritidis* foi considerada hidrofílica. O processo de adesão de *S. Enteritidis* foi termodinamicamente desfavorável na superfície de tomate cereja e, apesar disso, após a inoculação o número de células aderidas foi 6,50 log UFC·g<sup>-1</sup>. Não houve diferença significativa (p>0,05) entre os tratamentos com DCS, AL, US, US + NP e US + DET que apresentaram remoção bacteriana entre 1,54 e 1,60 log UFC·g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os melhores resultados foram observados após os tratamentos com NP e US + AL que reduziram 2,29 e 2,37 log UFC·g<sup>-1</sup> a população do patógeno, respectivamente. Essas soluções sanitizantes após o uso, não ofereceram risco de contaminação cruzada. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a adesão de *S. Enteritidis* na superfície de tomate cereja e a remoção de células decorrente dos tratamentos de sanitização. A microscopia eletrônica de transmissão revelou que os tratamentos de US+AL, NP e US promoveram desestruturação da cápsula bacteriana,

sendo que, no primeiro tratamento, pôde ser observada ruptura da membrana celular. Foi verificada alteração da estrutura e da dimensão das NP após a associação com US e isto pode ter influenciado no efeito menos pronunciado na inativação celular. Entre os tratamentos avaliados neste estudo, observou-se maior redução de *S. Enteritidis* após o uso de nanopartículas de prata e ultrassom associados com ácido láctico. Quanto a avaliação do efeito dos tratamentos na microbiota natural de tomate cereja e observou-se que dentre os tratamentos propostos, os tratamentos com ácido láctico 1 %, nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  associado ou não ao US apresentaram maiores reduções dos micro-organismos avaliados. Não houve diferença significativa para os valores de acidez titulável, pH, sólidos solúveis, cor instrumental, firmeza, conteúdo de licopeno e betacaroteno entre os tratamentos aplicados em tomate cereja. O conteúdo de ácido ascórbico foi modificado entre os tratamentos aplicados e ao longo do armazenamento. Estes resultados indicam que os tratamentos têm potencial para uso na sanitização de tomates cereja.

## ABSTRACT

SÃO JOSÉ, Jackline Freitas Brilhante de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april 2013. **Physical-chemical and microbiological characterization of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) minimally processed submitted to different sanitizers treatments.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: Afonso Mota Ramos and Maria Cristina Dantas Vanetti.

The sanitizing step is essential to contribute to safety and extension of shelf life of fruits and vegetables. This study aimed to evaluate the effect of treatment with ultrasound (US), chlorinated water (DCS), detergent-based surfactants (DET), lactic acid (LA) and silver nanoparticles (NP) on the inactivation of *Salmonella enterica* Enteritidis cells adhered to the surface of cherry tomato and the effect of these different sanitization treatments on natural microbiota contaminant and physicochemical characteristics of cherry tomatoes stored at 7 °C for 10 days. The evaluation of the natural microbiota of cherry tomato indicated no *Salmonella* sp., and for mesophilic aerobic, yeasts and molds, lactic acid bacteria, *Pseudomonas* sp., coliforms at 35 °C and psychrotrophic aerobic equal to 4.06, 4.30, 3.41, 2.78, 4.28, 2.99 log CFU•g<sup>-1</sup>, respectively. The average surface roughness of cherry tomato was equal to 2.66 µm which indicated the presence of surface irregularities that could accommodate microorganisms. Agreement with assessments of qualitative and quantitative hydrophobicity, the surface cherry tomato was considered hydrophobic and *S. Enteritidis* was considered hydrophilic. The adhesion process of *S. Enteritidis* was thermodynamically unfavorable in the cherry tomato surface, and yet, after inoculation the number of adherent cells was 6.50 log CFU•g<sup>-1</sup>. No significant difference (p>0.05) was observed between treatments with DCS, AL, US, US and US + NP + DET that presented bacterial removal among 1.54 and 1.60 log CFU • g<sup>-1</sup>, respectively. The best results were observed after treatment with NP and US + AL that reduced 2.29 and 2.37 log CFU•g<sup>-1</sup> of the pathogen population, respectively. These solutions sanitizers after use, offered no risk of cross contamination. The scanning electron microscopy showed adherence of *S. Enteritidis* on the surface of cherry tomatoes and removal of cells after sanitization treatments. The transmission electron microscopy revealed that treatment of US + AL, NP and US promoted disruption of bacterial capsule, and on the first treatment was observed breakage of cell membrane. Structure and size of the NP after association with US were modified and this may have influenced the less pronounced effect of cell inactivation.

Among the treatments evaluated in this study, there was a greater reduction of count of *S. Enteritidis* after the use of silver nanoparticles and lactic acid associated with ultrasound. Regarding the assessment of the effect of treatments on natural microbiota of cherry tomato and it was observed that among the treatments, treatments with 1% lactic acid, silver nanoparticles  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  associated or not with US had the largest reduction of micro-organisms evaluated. There was no significant difference in the values of titratable acidity, pH, soluble solids, instrumental color, firmness, lycopene and beta-carotene content among treatments in cherry tomato. The content of ascorbic acid was changed among treatments and during storage. These results indicate that the treatments have the potential for use in sanitizing cherry tomatoes.

## INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores, a busca por alimentos mais saudáveis, convenientes e práticos, resultaram em aumento na demanda de frutas e hortaliças minimamente processadas.

Entre as hortaliças que podem ser comercializadas após o processamento mínimo, destaca-se o tomate cereja. O tomate do tipo cereja (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme) é uma das variedades de tomate com grande popularidade em todo o mundo. O Brasil é reconhecido mundialmente como grande produtor de tomate e nos últimos anos investe no cultivo de tomate cereja, cujo consumo *in natura* é crescente. O cultivo foi impulsionado em razão do interesse da gastronomia moderna, pois se trata de um produto que apresenta como diferencial, o fato de ser saboroso e adocicado, a ponto de ser consumido como fruta ou como aperitivo.

Na cadeia de processamento mínimo, há riscos de contaminação por micro-organismos deterioradores e patogênicos em diversos pontos. Assim, o controle microbiológico torna-se essencial considerando que há relatos na literatura de surtos envolvendo consumo de frutas e hortaliças minimamente processadas contaminadas com micro-organismos patogênicos.

A capacidade de adesão de micro-organismos patogênicos, como *Salmonella*, à superfície de frutas e hortaliças, mostra a necessidade de estudos e de desenvolvimento de novas estratégias que colaborem para a segurança microbiológica do produto que chega ao consumidor. Isto evidencia que o controle microbiológico ainda é um desafio para a indústria de alimentos.

Dentre as etapas do processamento mínimo, a operação de lavagem associada ao uso de sanitizantes é considerada a etapa crítica para redução no número de micro-organismos. Por ser mais barato, apresentar boa dissolução em água, fácil manuseio e boa eficiência antimicrobiana, o cloro é o sanitizante mais usado pela indústria de alimentos tanto para higienização de superfícies de equipamentos quanto para frutas e hortaliças. Entretanto, há interesse na substituição do cloro devido à limitada redução de micro-organismos contaminantes na superfície de frutas e hortaliças e ainda, a possibilidade de formação de subprodutos tóxicos (trihalometanos) quando cloro reage com a matéria orgânica em fase de final decomposição.

Um ponto de grande importância que também deve ser considerado no momento da escolha do sanitizante é a exigência do consumidor por alimentos de qualidade que, além de atender aos requisitos higiênicos e sanitários, mantêm as características sensoriais e nutritivas.

Dentre os diferentes métodos alternativos de sanitização estudados, o ultrassom é uma tecnologia que vem ganhando espaço na indústria de alimentos. Esta alternativa pode ser utilizada com diferentes objetivos, dentre eles, a remoção de partículas aderidas a superfícies e a inativação de micro-organismos. Essa tecnologia associada à sanitizantes permite maior redução da contaminação microbiana de alimentos.

Além do ultrassom, que se trata de um agente físico de descontaminação de superfícies, compostos químicos como ácidos orgânicos, surfactantes e, ou detergentes e nanopartículas de prata são também alternativas para controle microbiológico de frutas e hortaliças.

Os ácidos orgânicos são constituintes naturais de muitos alimentos e também são amplamente utilizados como aditivos para conservação de alimentos. A aplicação destes ácidos na sanitização é sugerida pelo fato de inativar patógenos presente em frutas e hortaliças.

O uso de surfactantes e, ou detergentes tem função importante na higienização de frutas e hortaliças. Estes compostos podem ser muito eficazes e de acordo com a composição química da superfície do produto e a interação química com o micro-organismo, os detergentes podem romper as interações e remover patógenos em superfícies mais eficientemente.

As nanopartículas apresentam alto desempenho em razão do aumento da relação entre área superficial e volume, o que possibilita aumento na atividade antimicrobiana. Motivados pela alta reatividade das nanopartículas e pelo conhecimento das propriedades antibacterianas da prata, pesquisas têm sido desenvolvidas para permitir aplicações de nanopartículas de prata como agentes bactericidas.

Considerando a necessidade de ampliar as estratégias para o controle de contaminação por micro-organismos, torna-se necessário o estudo da aplicação de novos processos de sanitização e avaliação de seus efeitos tanto na qualidade microbiológica bem como nas características físico-químicas de hortaliças.

# CAPÍTULO 1

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Considerações gerais

O consumo de frutas e hortaliças tem aumentado expressivamente nas últimas décadas em função da sociedade moderna buscar hábitos de vida mais saudáveis (VANDEKIDEREN *et al.*, 2008; LÓPEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2009). No Brasil, o mercado desses produtos também cresceu em razão da consolidação da economia, da mudança dos hábitos alimentares dos consumidores e da evolução de sistemas de auto-serviço (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SÃO JOSÉ, 2009).

A área ocupada com o cultivo de hortaliças no Brasil é de 779 mil hectares e a produção de 17 milhões de toneladas. O valor de R\$ 26 bilhões relativos à produção das frutas e hortaliças corresponde a 26% do valor total da produção agrícola do Brasil, inferior apenas ao valor de produção dos cereais, leguminosas e oleaginosas (BRASIL, 2009). O Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo registrou o aumento do valor arrecadado resultante da produção das frutas e hortaliças frescas, não industrializadas no estado entre os anos de 2001 a 2005, que era R\$ 3 milhões e alcançou R\$ 5 milhões (HORTIBRASIL, 2009).

O tomate é a segunda hortaliça mais consumida no Brasil, ficando atrás somente da batata (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2010). O tomate, originário da América do Sul, é cultivado em quase todo o mundo, e a sua produção global duplicou nos últimos 20 anos. Um dos principais fatores para a expansão desta cultura é o crescimento do consumo. Entre 1983/85 e 2003/05, a produção mundial *per capita* de tomate aumentou cerca de 36%, passando de 14 kg por pessoa por ano para 19 kg (FAO, 2007). A cultura do tomate está concentrada nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia, que, juntos, respondem por 77% do volume comercializado (IBGE, 2003). Estima-se que um terço desse volume seja destinado ao processamento industrial, para a produção de alimentos como molhos, extratos, polpas, catchups, sucos, entre outros (GAMEIRO *et al.*, 2008).

A cadeia agroindustrial do tomate posiciona-se entre as mais importantes no contexto do agronegócio. Como matéria-prima para as indústrias processadoras de derivados, o tomate representa a atividade principal geradora de renda para um grande número de produtores, tornando-se importante fonte de renda regional (MELO e VILELA, 2004).

Uma das variedades de tomate com grande popularidade em todo o mundo é o tomate do tipo cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) (WANG *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010). O Brasil é reconhecido mundialmente como grande produtor de tomate rasteiro e nos últimos anos vem investindo no cultivo de tomate cereja, cuja demanda para o consumo *in natura* é crescente. O cultivo desta variedade ganha impulso devido ao aumento do interesse da gastronomia moderna (LENUCCI *et al.*, 2006), pois trata-se de um produto que apresenta como diferencial, o fato ser saboroso e adocicado, a ponto de ser consumido como aperitivo. O tomate tradicional possui sólidos solúveis totais entre 4 e 6 °Brix e as variedades cereja possuem entre 9 e 12 °Brix, o que caracteriza maior concentração de sólidos solúveis totais, principalmente os açúcares (ABHORTICULTURA, 2011). Outro ponto que deve ser ressaltado é o tamanho reduzido e grande versatilidade. A utilização do tomate tipo cereja como adorno, aperitivo e na confecção de pratos diversos é uma opção a mais de consumo dessa hortaliça (GUSMÃO *et al.*, 2006).

A demanda por tomate foi reforçada pela busca de alimentos mais saudáveis, favorecendo também o crescimento da venda do produto fresco. O tomate é um alimento com propriedades funcionais devido aos altos teores de vitaminas A e C, e licopeno (LENUCCI *et al.*, 2006; RAFFO *et al.*, 2006). Além de possuir propriedades antioxidantes, o tomate do tipo cereja destaca-se dos demais tipos de tomates pelo seu alto valor comercial e ampla aceitação pelo consumidor (LENUCCI *et al.*, 2006).

De forma geral, os frutos do tomateiro são altamente perecíveis e de película bastante fina, tornando-se matéria-prima frágil para a colheita e movimentação logística. Por ser um alimento amplamente consumido *in natura* e altamente sensível à contaminação por produtos tóxicos e micro-organismos, pode acarretar prejuízos à saúde pública (BORGUINI, 2002). Segundo Giordano e Ribeiro (2000), o tomate possui em sua composição, aproximadamente, de 93 a 95% de água.

## 2. Processamento mínimo

As diversas tendências de consumo de alimentos, a busca por alimentos mais saudáveis a serem incluídos na dieta do consumidor (ALEGRE *et al.*, 2011; GOODBURN e WALLACE, 2013) aliados à praticidade e conveniência proporcionadas pelos alimentos prontos (TOURNAS, 2005; LETHO *et al.*, 2011; GLOWACZ *et al.*, 2013) contribuíram para o aumento da demanda de frutas e hortaliças minimamente processadas (SREBERNICH, 2007; GRAÇA *et al.*, 2011; LETHO *et al.*, 2011).

A comercialização de produtos minimamente processados no Brasil iniciou-se na década de 90 e, este segmento do agronegócio apresentou grande crescimento no mercado (OLIVEIRA, 2005; SEBRAE, 2008). Este potencial pode ser associado à expansão dos serviços como restaurantes, hotéis, lanchonetes, visto que estes produtos oferecem uma série de vantagens como redução na geração de resíduos, aumento da qualidade higiênico-sanitária, padronização na forma e tamanho, diminuição nos custos adicionais com mão-de-obra e outros (SILVA, 2001).

O processamento mínimo de frutas e hortaliças refere-se às operações de lavagem, descascamento, corte, sanitização, centrifugação e embalagem, tornando-as prontas para o consumo ou preparo imediato, sem que percam a condição de produto *in natura*. Esse processamento proporciona ao consumidor um produto semelhante ao fresco com vida útil prolongada e, ao mesmo tempo, mantendo-se a qualidade nutritiva e sensorial (OLIVEIRA *et al.*, 2006; RICO *et al.*, 2007; MORETTI, 2007).

A qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas está diretamente relacionada à presença de micro-organismos deterioradores, que provocam alterações nas características sensoriais do produto e também, a micro-organismos patogênicos que, em determinada população, podem causar danos à saúde do consumidor (RICO *et al.*, 2007; LETHO *et al.*, 2011). Frutas e hortaliças possuem naturalmente ampla quantidade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ROMEO *et al.*, 2010). Micro-organismos contaminantes são provenientes de diversas fontes, incluindo cultivo, colheita, manipulação pós-colheita, processamento e distribuição (RICO *et al.*, 2007; ABADIAS *et al.*, 2008; TORNUK, *et al.*, 2011).

O controle microbiológico desse tipo de produto ainda é um desafio para a indústria de frutas e hortaliças minimamente processadas (ONGENG *et al.*, 2006; RICO *et al.*, 2007; LÓPEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2009; GUNDUZ *et al.*, 2010).

Na cadeia de produção de frutas e hortaliças minimamente processadas, a operação de lavagem associada ao uso de soluções sanitizantes é considerada a única etapa na qual pode ser alcançada a redução no número de micro-organismos deterioradores e patogênicos, contribuindo assim, para a segurança do produto (ARTÉS e ALLENDE, 2005; RUÍZ-CRUZ *et al.*, 2007; ALLENDE *et al.*, 2008c; RAHMAN *et al.*, 2011).

### **3. Sanitizantes usados na indústria de processamento mínimo**

A eficiência dos sanitizantes para tratamento de superfície de frutas e hortaliças pode ser limitada ou imprevisível quando grande quantidade de matéria orgânica está presente na água de lavagem (RUÍZ-CRUZ *et al.*, 2007; RAHMAN *et al.*, 2011). Dentre os sanitizantes empregados na indústria de alimentos, principalmente em produtos frescos, a maioria é a base de cloro e compostos clorados (ANTONIOLLI *et al.*, 2005; ALVARO *et al.*, 2009; NASCIMENTO e SILVA, 2010; CHEN e ZHU, 2011; CHEN *et al.*, 2013). A facilidade do uso, o baixo custo, atividade antimicrobiana e a completa dissolução em água, fazem com que os agentes clorados sejam frequentemente 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).

A ação oxidante e sanitizante dos derivados clorados é controlada pelo ácido hipocloroso (HClO), produto resultante da hidrólise da substância clorada, que é a forma de cloro livre disponível com amplo espectro de ação contra diferentes micro-organismos (PARISH *et al.*, 2003). A ação do ácido hipocloroso é dependente de pH, sendo que a concentração de HClO aumenta com decréscimo do valor de pH. Assim, os compostos clorados são mais efetivos em valores de pH baixos quando a proporção de ácido hipocloroso é maior (ANDRADE, 2008). Embora o modo exato de ação do cloro não seja bem esclarecido, sabe-se que o principal efeito causado pelo ácido hipocloroso é a atividade oxidativa. Compostos à base de cloro atuam sobre as células microbianas na forma de ácido hipocloroso (HClO), que libera oxigênio, que combina com os componentes do protoplasma celular. O próprio cloro

pode se juntar a proteínas de membrana celular e interferir no metabolismo microbiano, principalmente na inibição de enzimas da via glicolítica (VEIGA, 2003).

As concentrações recomendadas de cloro residual livre para a sanitização de frutas e hortaliças variam de 50 a 200 mg·L<sup>-1</sup> em um tempo de contato de 1 a 30 minutos (PARISH *et al.*, 2003; RUÍZ-CRUZ *et al.*, 2007; HUANG e CHEN, 2011). Entretanto, em condições típicas de lavagem de frutas e hortaliças na cadeia de processamento mínimo, a eficiência do cloro em reduzir a contaminação é limitada, alcançando a proporção de um a dois ciclos logarítmicos na população de microorganismos (LEE *et al.*, 2004; RUÍZ-CRUZ *et al.*, 2007; LEE e BAEK, 2008; MAHMOUND e LINTON, 2008; PARK *et al.*, 2009; HUANG e CHEN, 2011).

O cloro é uma substância corrosiva, que pode provocar irritações na pele e no trato respiratório (ALVARO *et al.*, 2009). Além disso, outra preocupação com o uso do cloro está associada à possibilidade de hipercloração da água residual que, associada ao alto conteúdo de carbono orgânico, pode resultar em concentrações elevadas de trihalometanos e outros subprodutos da desinfecção (RYAN-BARRY *et al.*, 2008; RUÍZ-CRUZ *et al.*, 2007; RICO *et al.*, 2007; SELMA *et al.*, 2008; RAHMAN *et al.*, 2011). Os trihalometanos são considerados carcinogênicos, e são também indicadores da possível presença de outros compostos organoclorados (MACÊDO *et al.*, 2001; ARTÉS *et al.*, 2009; RAHMAN *et al.*, 2011). A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classifica esses subprodutos do processo de cloração como cancerígenos e a Agência de Proteção ao Meio Ambiente (*Environmental Protection Agency-EPA*) estabeleceram em 1998, o limite de concentração máxima de 80 µg·L<sup>-1</sup> para trihalometanos totais. Muitos países europeus tais como a Alemanha, têm restringido este limite a 10 µg·L<sup>-1</sup> (MACÊDO *et al.*, 2001; PAVÓN *et al.*, 2008). No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde de nº 2914 de 14 de dezembro de 2011, que estabelece normas para a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, indica que a concentração máxima permitida de trihalometanos totais em água é de 0,1 mg·L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011).

Neste contexto, os compostos clorados têm sido foco de preocupação ambiental e alguns grupos ambientalistas têm sugerido a extinção 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). Em países da Europa como Holanda, Suécia, Alemanha e Bélgica, o uso do cloro em

produtos minimamente processados é proibido (RICO *et al.*, 2007; NASCIMENTO e SILVA, 2010). Além disso, há estudos sobre patógenos emergentes que seriam mais tolerantes a esses compostos clorados, o que gera dúvida quanto ao uso do cloro na indústria de minimamente processados (ALLENDE *et al.*, 2008a; ALVARO *et al.*, 2009).

A sanitização é uma etapa essencial para atribuir maior segurança e extensão da vida de prateleira de produtos minimamente processados e, como futuras restrições quanto ao uso do cloro são desejáveis, há a necessidade da busca por tecnologias alternativas (RUÍZ-CRUZ *et al.*, 2007; ALLENDE *et al.*, 2008b; RICO *et al.*, 2008; VANDEKINDEREN *et al.*, 2008; ALVARO *et al.*, 2009; GRAÇA *et al.*, 2011; CHEN e ZHU, 2011). Concomitantemente, há também a busca por técnicas de desinfecção capazes de reduzir com maior eficiência, a contaminação microbiana na água de lavagem e nos produtos minimamente processados (ONGENG *et al.*, 2006; SÃO JOSÉ e VANETTI, 2012).

Considerando a importância da etapa de sanitização para o processamento mínimo de frutas e hortaliças, o estudo de métodos e, ou agentes alternativos devem receber atenção especial. Dentre as alternativas propostas destacam-se uso de luz ultravioleta, irradiação, ozônio (MARTÍN-DIANA *et al.*, 2006; SELMA *et al.*, 2008), ácido peracético (ALVARO *et al.*, 2009), água eletrolisada (ABADIA *et al.*, 2008; RICO *et al.*, 2008; ÖLMEZ e KRETZSCHMAR, 2009; GRAÇA *et al.*, 2011), ácidos orgânicos (AKBAS e ÖLMEZ, 2007a; AKBAS e ÖLMEZ, 2007b), o uso do ultrassom (GUERRERO *et al.*, 2001; SEYMOUR *et al.*, 2002; MASON, 2005, CAO *et al.*, 2010; SÃO JOSÉ e VANETTI, 2012) e soluções com prata (AJLOUNI, 2003; GOPAL *et al.*, 2010)

O objetivo principal destas alternativas para sanitização é assegurar a conservação de alimentos, mantendo seu valor nutritivo e as características sensoriais (textura, cor e sabor) inalterados, com baixo consumo de energia, à custo competitivo, respeito pelo ambiente e alto grau de segurança (KODA *et al.*, 2009; GÓMEZ-LÓPEZ *et al.*, 2010; CHEMAT *et al.*, 2011).

### 3.1. Ultrassom

As ondas ultrasônicas são ondas mecânicas que se propagam através de qualquer meio material com frequência maior que 16 kHz. Essas ondas correspondem a uma região do espectro acústico, o qual 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 é uma tecnologia adotada na indústria de eletrônicos como descontaminante de superfícies e nos últimos anos, tem sido objeto de estudo e desenvolvimento com intuito de possibilitar a sua aplicação na indústria de alimentos (DOLATOWSKI *et al.*, 2007; MIZRACH, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2010; CHEN e ZHU, 2011).

No processamento de alimentos, o ultrassom de alta intensidade em baixas frequências de 20 a 100 kHz tem utilidade na inativação de micro-organismos (PIYASENA *et al.*, 2003). Esta inativação é consequência de um processo denominado cavitação que gera energia mecânica e química localizada (GOGATE e KABADI, 2009).

Os efeitos químicos provocados pelo ultrassom ocorrem devido ao fenômeno de cavitação acústica, o qual engloba a nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquido exposto a irradiação com ondas ultrasônicas de baixa frequência. O ultrassom se propaga através de um líquido em ciclos alternados de compressão e expansão. Caso a onda acústica tenha amplitude suficientemente alta, pode vencer as forças intermoleculares num ponto do líquido criando uma cavidade (GOGATE e KABADI, 2009). Uma vez formada a cavidade (nucleação) durante a etapa de expansão (pressão negativa) os gases e vapores presentes no líquido podem se difundir para a cavidade (crescimento). Na etapa de compressão (pressão positiva), as moléculas de gases e vapores presentes no interior das bolhas não retornam completamente para o líquido resultando em aumento efetivo do tamanho da cavidade. Assim, durante os sucessivos ciclos de compressão e expansão, ocorre aumento das dimensões da cavidade, até que alcance seu diâmetro crítico, implodindo violentamente. A implosão das bolhas de cavitação provoca a liberação de grande quantidade de energia, resultando em regiões de altas temperaturas

(4726,85 °C) e pressões (1000 bar) denominadas de *hot spots*. Em se tratando da água, a alta energia gerada pelo colapso de uma bolha de cavitação contendo moléculas da água na forma vapor e de gotículas, leva à clivagem de moléculas e conseqüentemente formação de radicais  $H^{\cdot}$  e  $OH^{\cdot}$ . Esses radicais podem se combinar produzindo água ou se rearranjarem para a formação de radicais livres que são gerados em função da dissociação de vapores presos nas bolhas. Contudo,  $H_2O_2$ ,  $H_2$ ,  $HO^{\cdot}$  e  $H^{\cdot}$  podem levar a formação de outros produtos caso outras espécies estejam presentes no meio irradiado. Todas essas alterações promovidas pela cavitação contribuem para ação de limpeza sobre as superfícies (PIYASENA *et al.*, 2003; GOGATE e KABADI, 2009).

Quando o ultrassom é empregado associado com agentes químicos como  $Cl_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_3$ , o intenso gradiente de pressão permite a penetração desses agentes oxidantes através da membrana celular dos micro-organismos. Além disso, a cavitação pode facilitar a desagregação de micro-organismos presentes e assim, aumentar a eficiência dos sanitizantes químicos (GUERRERO *et al.*, 2001; GIL *et al.*, 2009; GOGATE e KABADI, 2009).

O efeito de inativação do ultrassom também pode estar relacionado também à geração de cavitação intracelular e choques mecânicos podem prejudicar os componentes celulares estruturais e funcionais até o ponto de lise celular (CHEMAT *et al.*, 2011). O mecanismo de morte microbiana é principalmente devido ao enfraquecimento das membranas celulares, aquecimento localizado e produção de radicais livres. A destruição e desintegração de micro-organismos pelas ondas ultrasônicas está relacionada à formação de bolhas durante o processo de cavitação. Vários trabalhos (SEYMOUR *et al.*, 2002, SÃO JOSÉ, 2009; CAO *et al.*, 2010; SAGONG *et al.*, 2011; CHEN e ZHU, 2011) mostram a inativação de micro-organismos por ultrassom em combinação ou não com outros tratamentos.

Sabe-se que a extensão dos efeitos químicos e físicos são fortemente relacionados à amplitude das ondas ultrasônicas, tempo de exposição, volume processado, composição dos alimentos e temperatura do tratamento (KODA *et al.*, 2009; GÓMEZ-LÓPEZ *et al.*, 2010; TIWARI *et al.*, 2010). O desempenho destes fatores é também afetado pela forma, tipo ou diâmetro dos micro-organismos. Células maiores são mais sensíveis do que as menores, provavelmente devido à sua maior área superficial. Bactérias gram-positivas são reconhecidas como mais resistentes do que as bactérias gram-negativas, por possuírem parede celular mais

espessa que lhes proporciona melhor proteção contra os efeitos do ultrassom. De acordo com a literatura, as diferenças na sensibilidade de células também pode ser devido a camada mais firmemente aderente de peptidoglicano em células gram-positivas (PIYASENA *et al.*, 2003; ANANTA *et al.*, 2005).

O ultrassom pode ser aplicado com diferentes finalidades na indústria de alimentos como inativação de enzimas, em processos de mistura e homogeneização, extração de compostos, filtração e secagem, processamento e conservação. Estudos que envolvem a aplicação do ultrassom na área de ciência e tecnologia de alimentos aumentaram nos últimos anos (SEYMOUR *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003; ENTEZARI *et al.*, 2004; VALERO *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008; PATIL *et al.*, 2009; 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). Isso ocorreu em razão principalmente dos seus efeitos promissores no processamento e conservação de alimentos.

O ultrassom proporciona vantagens em termos de rendimento, produtividade e seletividade, com melhor tempo de processamento, melhoria da qualidade, redução dos danos químicos e riscos físicos. Atualmente, a aplicação desta tecnologia tem atraído atenção por seu papel na sustentabilidade do meio ambiente e por não causar danos enquadrando-se, assim, no conceito de tecnologia verde (CHEMAT *et al.*, 2011).

Outro fator importante para a utilização do ultrassom na indústria de alimentos é o fato de não gerar odores desagradáveis e a perda de nutrientes (LEE *et al.*, 2003; PIYASENA *et al.*, 2003), somado ao fato da possibilidade de ser aplicado à temperatura ambiente e sem geração de calor (FERNANDES e RODRIGUES, 2007).

Um dos primeiros estudos realizados com ultrassom que tinha como objetivo a inativação de micro-organismos foi conduzido por Munkasci e Elhami (1976), que observaram a redução de 93 % dos coliformes presentes em amostras de leite integral tratadas com ultrassom. Anos depois, Salleh-Mack e Roberts (2007) citaram que a *Food and Drug Administration* indicou o ultrassom como tecnologia potencial para inativação de micro-organismos.

Na literatura há registros de estudos sobre os efeitos da aplicação do ultrassom nas características nutricionais de alimentos, principalmente em sucos de

frutas e há relatos de manutenção ou melhora dessas características. GÓMEZ-LÓPEZ *et al.* (2010) observaram que o uso do ultrassom na pasteurização de suco de frutas confere alta qualidade quanto ao frescor, segurança microbiológica e valor nutricional. Tiwari *et al.* (2009) e Zenker *et al.* (2003) observaram retenção de ácido ascórbico das amostras de sucos tratadas com ultrassom. Em estudo realizado por Tiwari *et al.* (2010) foi observada retenção de conteúdo de antocianinas em sucos de uva: 97,5 % de cianidina, 48,2 % de malvanidina e 80,9 % de delphinidina após tratamento com ultrassom.

Apesar de grande parte dos estudos com ultrassom serem realizados em sistemas líquidos (SAN MARTÍN *et al.*, 2001; GUERRERO *et al.*, 2001; ZENKER *et al.*, 2003), sabe-se que micro-organismos contaminantes em alimentos sólidos também podem ser inativados por essas ondas (SEYMOUR *et al.*, 2002; MASON *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2011; SÃO JOSÉ e VANETTI, 2012).

A associação do ultrassom a agentes químicos pode contribuir para inativação de micro-organismos. Seymour *et al.* (2002) registraram que a associação do ultrassom com hipoclorito de sódio a  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  reduziu  $1,2 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  a mais de células de *Salmonella* Typhimurium em alface em comparação ao efeito produzido por tratamento apenas com solução clorada. Huang *et al.* (2006) aplicaram o ultrassom  $170 \text{ kHz}$  combinado ao dióxido de cloro  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e observaram redução de cerca de  $4 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  na população de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7. Zhou *et al.* (2009) observaram redução de 0,7 a 1,1 ciclo log a mais de *E. coli* O157:H7 em espinafre tratados em com ultrassom combinado a sanitizantes do que o resultado obtido apenas com os sanitizantes. São José e Vanetti (2012) avaliaram o efeito do ultrassom associado a ácido peracético na remoção de *S. Typhimurium* aderida a superfície de tomate cereja e observaram a remoção de  $4 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Cao *et al.* (2010) relataram que o ultrassom é eficiente para inibir a incidência de deterioração e preserva a qualidade no pós-colheita de morangos. Resultado semelhante foi obtido por Chen *et al.* (2011) que verificaram que o uso de dióxido de cloro combinado ao ultrassom permite manutenção da qualidade no pós colheita de ameixa japonesa (*Prunus salicina* L.).

### 3.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são constituintes naturais de muitos alimentos e também são amplamente utilizados como aditivos para conservação de alimentos. Estes compostos podem ser usados por adição direta ou por meio de fermentação (PARISH *et al.*, 2003). São compostos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) e são muito utilizados em função de sua atividade antimicrobiana (RAYBAUDI-MASSILA *et al.*, 2009; HUANG e CHEN, 2011; PARK *et al.*, 2011).

A ação conservante de ácidos orgânicos é, em parte devido ao seu efeito sobre o pH do alimento, mas principalmente os resultados das propriedades antimicrobianas do moléculas não dissociadas de ácido. Nesta forma, os ácidos são capazes de difundir através da membrana da célula microbiana e, quando o pH intracelular é maior do que a do meio circundante, se dissociam, liberando prótons e acidificação do citoplasma (RICKE, 2003; HUANG e CHEN, 2011). Para eliminar os prótons em excesso e manter o pH interno, as células têm que gastar energia e alteram as atividades metabólicas. Dessa forma, há alteração do transporte de nutrientes devido a alteração na permeabilidade de membrana, quelação de íons metálicos e redução da força próton motora (PARISH *et al.*, 2003; RAYBAUDI-MASSILA *et al.*, 2009; HUANG e CHEN, 2011).

Ácidos orgânicos são conhecidos pela capacidade de inativar patógenos envolvidos em surtos de doenças com alimentos (AKBAS e ÖLMEZ, 2007), o que pode permitir sua aplicação em produtos frescos. Esses compostos podem agir rapidamente, inativar amplo espectro de bactérias, serem utilizados em ampla faixa de temperatura e não são afetados pela dureza da água. Entretanto, podem apresentar desvantagens quanto ao custo, odor e corrosividade (MARRIOTT e GRAVANI, 2006).

Ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético e ácido tartárico têm sido descritos como fortes antimicrobianos contra micro-organismos mesófilos e psicrotróficos em frutas e hortaliças minimamente processadas (BARI *et al.*, 2005; UYTTENDAELE *et al.*, 2004). O ácido ascórbico e seus derivados são GRAS quando utilizados como antioxidantes em frutas e hortaliças e sucos de frutas para prevenir o escurecimento e reações oxidativas (RICO *et al.*, 2007).

Ácido láctico, acético e cítrico têm capacidade de inibir crescimento de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em produtos frescos (AKBAS e

ÖLMEZ, 2007; LAURY *et al.*, 2009). Apesar do ácido láctico ser menos lipossolúvel do que ácido acético ou sórbico e se difundir mais lentamente através da membrana celular (SAMELIS e SOFOS, 2003), em estudo de Huang e Chen (2011) este ácido orgânico (ácido láctico 1%) foi o mais eficiente e promoveu redução de 1,9 log UFC.g<sup>-1</sup> de *E. coli* O157:H7 em espinafres.

A eficácia do ácido láctico contra bactérias gram-negativas está relacionada ao fato das moléculas de ácido alcançarem o periplasma por meio das porinas da membrana externa (ALAKOMI *et al.*, 2000) e também relacionada a processos de estresse oxidativo, rompimento de membrana e acúmulo de ânions tóxicos no interior da célula (TAJKARIMI e IBRAHIM, 2011). Diferentes concentrações de ácido láctico isoladamente ou em combinação com outros produtos químicos têm demonstrado ser eficaz na eliminação de bactérias patogênicas (AKBAS e ÖLMEZ, 2007). Virto *et al.* (2005) constataram que numa avaliação da cinética de inativação de *Yersinia enterocolitica*, o ácido láctico mostrou-se mais efetivo que o ácido cítrico, independente da concentração utilizada (VIRTO *et al.*, 2005).

Concentrações de 0,5% de ácido láctico ou de 0,5% de ácido cítrico (por 2 minutos) mostraram-se tão efetivas quanto uso de solução clorada a 100 mg·L<sup>-1</sup> para redução da população de *E. coli* e *L. monocytogenes* inoculadas em alfaces minimamente processadas (AKBAS e ÖLMEZ, 2007a). Em outra pesquisa, os mesmos autores verificaram maior eficiência ácido láctico (5 mL·L<sup>-1</sup>) e também do ácido cítrico (5 g·L<sup>-1</sup>), em relação água ozonizada (4 mg·L<sup>-1</sup>) e a solução clorada (100 mg·L<sup>-1</sup>) na sanitização de alfaces minimamente processadas (AKBAS e ÖLMEZ, 2007b).

Sagong *et al.* (2011) constataram efeito sinérgico no uso de ácido láctico (2%), cítrico (2%) e málico (2%) combinados com ultrassom (40 kHz), por 5 minutos, na inativação de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *L. monocytogenes* inoculadas em alfaces orgânica, sem afetar significativamente a cor e textura.

Segundo Ölmez e Kretzchmar (2009), alguns ácidos orgânicos podem afetar negativamente a qualidade sensorial do produto sanitizado. Dessa forma, deve-se atentar para a escolha correta do ácido orgânico e respectiva concentração de maneira a impedir a ocorrência de efeitos indesejáveis no produto.

### 3.3. Surfactantes/Detergentes

Surfactantes são moléculas com propriedades tensoativas que possuem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, os quais determinam propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, lubrificação, ação espumante ou antiespumante, capacidade molhante, solubilização e detergência. Essas moléculas podem ser produzidas por síntese química (surfactantes sintéticos) ou biológica (biossurfactantes). Os surfactantes são categorizados em catiônicos, aniônicos, não-iônicos e zwitteriônicos, de acordo com a carga exibida pelo grupo hidrofílico da molécula, já que o grupo hidrofóbico pouco varia (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; RIZZATTI e ZANETTE, 2009).

Tensoativos, em baixas concentrações, têm a capacidade de serem adsorvidas na interface de dispersões líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido, reduzindo a tensão interfacial. A adsorção na interface dos líquidos é consequência da estrutura molecular dos surfactantes, ou seja: a parte polar ou iônica interage fortemente com a fase aquosa por meio de forças do tipo dipolo-dipolo e a outra, a parte alifática apolar, interage com a fase orgânica. Esta dupla solubilidade faz com que a região de maior estabilidade para a molécula tensoativa seja na interface entre os dois líquidos. Tal fato é muito importante para o procedimento de higienização, que para ser eficiente exige a ocorrência de contato entre os agentes de limpeza e os resíduos a serem removidos (ANDRADE, 2008). A água não molha bem a superfície, pois apresenta alta tensão superficial, equivalente a  $72 \text{ mJ/m}^2$ . Essa tensão deve ser diminuída a valores de  $36 \text{ mJ/m}^2$  para otimizar o contato entre o detergente e o resíduo a ser removido (WOODS, 2004). Essa redução da tensão superficial da água é conseguida com o uso de tensoativos.

Estes compostos são caracterizados pela capacidade de alterar propriedades superficiais e interfaciais de um líquido, e permitem a formação de agregados chamados micelas. A concentração mínima na qual se inicia formação de micelas é denominada Concentração Micelar Crítica (CMC), sendo esta importante característica do surfactante (BARROS *et al.*, 2007).

De maneira geral, os tensoativos são: i) solúveis em água fria; ii) ativos em concentrações muito baixas, podendo níveis de 0,1 % diminuir a tensão superficial da água em torno de 50 %; ii) indiferentes à dureza da água, à exceção dos sabões;

iv) não formam precipitados; v) atuam em diferentes pH; vi) em alguns casos, são bactericidas; e vii) não são corrosivos às superfícies (ANDRADE, 2008).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis no mercado é sintetizada a partir de derivados do petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado as novas legislações de controle do meio ambiente levou a procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002; BARROS *et al.*, 2007).

Segundo Raiden (2002) detergentes podem ser muito eficazes e, de acordo com a composição química da superfície do produto e a interação química com o micro-organismo, os detergentes podem romper as interações e remover patógenos em superfícies mais rapidamente.

O uso de detergentes para a higienização de frutos se mostra conveniente uma vez que permite o controle de patógenos em pós-colheita (CRUZ *et al.*, 2010). Costa *et al.* (2012) avaliaram dois métodos de higienização de alfaces convencionais e orgânicas sendo um deles com aplicação de detergente previamente ao uso do sanitizante e ao compararem os resultados após o uso de detergente e após a sanitização, observaram que o uso do detergente foi suficiente para a redução da contaminação por coliformes a 45°C e que a execução da etapa seguinte seria desnecessária.

Brito *et al.* (2013) avaliaram o uso de detergentes na sanitização de mangas cv. ‘Tommy Atkins’ e verificaram que esse procedimento de higienização foi eficiente quando combinado com a temperatura controlada durante os 14 dias de armazenamento, o que ocasionou menores alterações nos valores de pH, acidez titulável e sólidos solúveis.

### **3.4. Nanopartículas de Prata**

A nanotecnologia tem tido muitos avanços na última década e novas aplicações tecnológicas ainda estão em processo de descoberta (ANNAMALAI *et al.*, 2013). Esta ciência busca descrever a criação e uso de materiais com características estruturais entre átomos e materiais com pelo menos uma dimensão nano. A síntese de nanopartículas de metais é uma área ampla e em expansão devido ao seu potencial de aplicabilidade em diversos setores como eletrônica, química, energia e desenvolvimento de medicamentos. As nanopartículas

apresentam novas ou melhoradas propriedades, dependendo do seu tamanho, morfologia e distribuição (SAXENA *et al.*, 2012).

Nanomateriais auxiliam na busca por soluções em casos de problemas tecnológicos e ambientais em diferentes áreas como conversão de energia solar, catálises, medicina e tratamento de água (SHARMA *et al.*, 2009). O alto desempenho de nanopartículas está relacionado ao aumento da relação entre área superficial e volume, o que permite aumento na atividade antimicrobiana de nanopartículas de metais (EMAMIFAR *et al.*, 2011; ANNAMALAI *et al.*, 2013).

Dentre as nanopartículas que vem sendo estudadas, destacam-se as nanopartículas de prata. Sais de prata e a prata são bem conhecidos como agentes antimicrobianos e atuam em processos infecciosos e na prevenção de doenças (GOPAL *et al.*, 2010; CHAMAKURA *et al.*, 2011; DALLAS *et al.*, 2011). A prata é um agente antimicrobiano que apresenta toxicidade forte em relação a ampla gama de micro-organismos e, ao mesmo tempo, baixa toxicidade em relação aos humanos (DALLAS *et al.*, 2011).

Alguns produtos contendo prata são regularmente usados em processos clínicos, como por exemplo, materiais biomédicos revestidos de prata como cateteres e a sulfadiazina de prata. Apesar de ser relativamente não tóxico para as células humanas, a prata possui propriedades antimicrobianas para amplo espectro de bactérias encontradas tanto em processos industriais bem como no corpo humano. Dessa forma, a prata em suas várias formas apresenta uma ampla gama de aplicações em produtos de consumo, industriais e produtos médicos hospitalares (DALLAS *et al.*, 2011). O efeito antibacteriano das nanopartículas de prata em bactérias gram negativas e gram positivas variam de acordo com o tamanho da partícula (KIM *et al.*, 2007; PAL *et al.*, 2007; PANÁCEK *et al.*, 2006; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN *et al.*, 2008)

Concentrações baixas de prata e de cobre têm sido utilizadas em sistemas de desinfecção de água, piscinas e sistemas de refrigeração (GOPAL *et al.*, 2010; DALLAS *et al.*, 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004) autoriza a presença de até  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de prata em água potável e considera este valor como sem riscos para saúde humana.

O desenvolvimento de produtos que contém nanopartículas de prata tem expandindo, sendo encontradas em roupas, embalagens para alimentos, pomadas, curativos, dentre outros itens (LARA *et al.*, 2010). A atividade antimicrobiana das

nanopartículas é relacionada a diversos mecanismos incluindo indução de estresse oxidativo devido à geração de substâncias reativas ao oxigênio que podem degradar a membrana celular e favorecer a saída de íons da superfície das nanopartículas que se ligam a membrana e causam morte celular (DALLAS *et al.*, 2011; EMAMIFAR *et al.*, 2011).

Sondi e Salopek-sondi (2004) indicaram a ação das nanopartículas na superfície da membrana alterando sua funcionalidade, degradação de lipopolissacarídeos, acúmulo das nanopartículas dentro da membrana formando poros e causando grande aumento na permeabilidade da membrana. A interação com íons prata, que podem ser liberados das nanopartículas, com grupos tióis e formação de S-Ag ou ligações dissulfeto podem danificar proteínas bacterianas, interromper a cadeia transportadora de elétrons e dimerizar o DNA. Este mecanismo também ocorre com vírus conferindo a prata propriedades antivirais (KIM *et al.*, 2008). Nanopartículas de prata podem danificar células bacterianas e vírus por outros mecanismos além da liberação de íons  $\text{Ag}^+$ , como por exemplo, danos à parede celular que pode levar a perda de permeabilidade, colapso osmótico e liberação do material intracelular (PANACEK *et al.*, 2006).

De acordo com Damm *et al.* (2007), os íons prata formam complexos com o enxofre, fósforo, nitrogênio e oxigênio presentes em grupos funcionais de enzimas bacterianas levando a uma desestabilização da membrana celular bem como distúrbios ao metabolismo celular. Além disso, os íons prata interagem com o DNA bacteriano impedindo a reprodução celular. Segundo estes autores, como os íons de prata atacam a célula de uma maneira muito complexa o risco de seleção de micro-organismos resistentes é muito menor quando comparado aos antibióticos.

Lara *et al.* (2010) avaliaram a ação de nanopartículas de prata sobre isolados bacterianos resistentes a vários antibióticos e não encontraram diferenças na atividade bactericida sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas o que sugere que as nanopartículas são agentes antibacterianos de amplo espectro. A toxicidade das nanopartículas de prata contra bactérias depende da sua forma e tamanho (PANACEK *et al.*, 2006).

Tiwari e Behari (2009) observaram que células de *E. coli* DH5 tratadas com 135 kHz durante 15 min em solução de nanopartículas com  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ocasionaram 50 % da perda de viabilidade e esta perda foi igual a 40 % quando as células foram tratadas com ultrassom a 35 kHz.

Atualmente, há interesse no uso de prata como substituto ao cloro (AJLOUNI, 2003; GOPAL *et al.*, 2010) na sanitização de frutas e hortaliças. Chamakura *et al.* (2011) compararam o efeito bactericida de nanopartículas de prata com sanitizantes comumente utilizados e observou que as nanopartículas tiveram efeito bactericida mais lento e relacionado a mecanismo que envolve várias etapas que incluem dano na parede celular e na membrana citoplasmática.

Gopal *et al.* (2010), ao sanitizar alface com solução contendo  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de prata observaram 50% de redução na contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae e as consideraram muito sensíveis a prata mesmo em baixas concentrações.

Panacek *et al.* (2006), ao realizar experimentos realizados com microscopia eletrônica de varredura por tunelamento e espectrometria de energia dispersiva de raios X, observaram nanopartículas de prata não só na superfície da membrana celular mas também no interior da bactéria. Isto sugere a possibilidade de que as nanopartículas de prata podem também penetrar no interior das bactérias e causar danos ao interagir com o fósforo e compostos contendo enxofre tais como DNA.

Além de alcançar o interior de células bacterianas, segundo Zhang *et al.* (2012), nanopartículas de prata penetraram através da película externa da pêra e mantiveram-se firmemente ligadas aos tecidos da fruta devido à elevada área superficial das nanopartículas. A possibilidade de permanência das nanopartículas no tecido vegetal chama a atenção para o risco de internalização da substância e alcançar o consumidor final do produto. Dessa forma, além de avaliar o efeito antimicrobiano da substância frente a micro-organismos, a presença de resíduos de prata e descarte destes deve ser criteriosamente avaliada.

#### 4. 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, n.1-2, p. 121-129, 2008.

ABHORTICULTURA. **Tomate Cereja - Sabor e rentabilidade no mesmo produto.** Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?id=4864>>. Acesso em: 10 de junho de 2011.

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.

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.

AJLOUNI, S. **Personal Communication.** 2003. Melbourne School of Land and Environment, The University of Melbourne, Parkville, Victoria.

AJLOUNI, S.; SIBRANI, H.; PREMIER, R., TOMKINS, B. Ultrasonication and fresh produce (*Cos lettuce*) preservation. **Journal of Food Science**, v. 71, n.2, p. 62–68, 2006.

AKBAS, MY; ÖLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, n.66, p.619-624, 2007a.

AKBAS, M.Y.; ÖLMEZ, H. Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut iceberg

lettuce. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, n.14. p. 2609–2616, 2007b.

ALAKOMI, H.-L. ; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I.M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p.2001-2005, 2000.

ALEGRE, I.; VIÑAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GC. **Food Microbiology**, v.28, n.1, p.59-66, 2011.

ALLENDE, A.; McEVOY, J. ; TAO, 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.

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.

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.

ANNAMALAI, A.; CHRISTINA, V.L.P.; SUDHA, D.; KALPANA, M.; LAKSHMI, P.T.V. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of Au NPs using *Euphorbia hirta* L. leaf extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.108, p.60–65, 2013.

ANANTA, E.; VOIGT, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; AND KNORR, D. Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.3, p.271–278, 2005.

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.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL, 2011. Brasil. Instituto FNP, 2010, 502p.

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

ARTÉS, F.; GÓMEZ, P.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V.; ARTÉS-HERNANDEZ, F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, n.3, p. 287-296, 2009.

BARI, M.L.; UKUKU, D.O.; KAWASAKI, T.; INATSU, Y.; ISSHIKI, K.; KAWAMOTO, S. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. **Journal of Food Protection**, v.68, n.7, p. 1381–1387, 2005.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedade químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v.30, n.2, p.409-414, 2007.

BORGUINI, R. G. **Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) orgânico: o conteúdo nutricional e a opinião do consumidor**. 2002. 110 f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas**. 2009. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS)>. Acesso em: 2 mai. 2011.

\_\_\_\_\_. 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.

BRITO, L.R.; BORGES, P.R.S.; SIEBENEICHLER, S.C.; CARVALHO, E.E.N.; LEAL, T.C.A.B. Effect of storage temperature and sanitation form on the quality of ‘Tommy Atkins’ mangoes produced at in PeixeTocantins State. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.1, p. 32-39, 2013.

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.

CHAMAKURA, K.; PEREZ-BALLASTERO, R.; LUO, Z.; BASHIR, S.; LIU, J. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.84, n.1, p.88-96, 2011.

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

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. 61, n.2-3, p.117–123, 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.

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.

COSTA, E. A.; FIGUEIREDO, E. A. T.; CHAVES, C. S.; ALMEIDA, P. C.; VASCONCELOS, N. M.; MAGALHÃES, I. M. C.; MORAES, A. F.; PAIXÃO, L. M. N. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lacuta sativa* l.) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 387-392, 2012.

CRUZ, M. J. S.; CLEMENTE, E.; CRUZ, M. E. S.; MORA, F.; COSSARO, L.; PELISSON, N. Efeito dos compostos naturais bioativos na conservação pós colheita de frutos de mangueira cv. Tommy Atkins. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 428-433, 2010.

DALLAS, P.; SHARMA, V. K.; ZBORIL, R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.166, n.1-2, p.119-35, 2011.

DAMM, C., MUNSTED, H., ROSCH, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 42, n.1, p. 6067–6073, 2007.

DOLATOWSKI, Z.J.; STADNIK, J.; STASIAK, D. Applications of ultrasound in food technology. **Acta Scientiae Polonorum Technologia Alimentaria**, v.6, n. 3, p. 89-99, 2007.

EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD. S.; Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**, v. 22, n.3, p.408- 413, 2011.

ENTEZARI, M. H.; NAZARY, S. H.; KHODAPARAST, M. H. H. The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 379-384, 2004.

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.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). **Country information:** Brazil: agriculture sector. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 21 maio. 2011.

GAMEIRO, A. H.; FILHO, J. V. C.; ROCCO, C. D.; RANGEL, R. Modelagem e gestão das perdas no suprimento de tomates para processamento industrial. **Gestão e Produção**, v. 15, n.1, p. 101-115, 2008.

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.

GIORDANO, L.B.; RIBEIRO, C.S.C. Origem, Botânica e Composição Química do Fruto. In: SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. (org.) **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Embrapa hortaliças, 2000. 168p.

GLOWACZ, M.; MOGREN, L.M.; READE, J.P.H.; COBB, A. H.; MONAGHAN, J. M. Can hot water treatments enhance or maintain postharvest quality of spinach leaves?. **Postharvest Biology and Technology**, v.81, p.23-28, 2013.

GOODBURN, C.; WALLACE C.A. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. **Food Control**, v.32, n.2, p.418-427, 2013.

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

GOPAL, A.; COVENTRY, J.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; AJLOUNI, S. Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. **Food Microbiology**, v. 27, n.2, p.210-219, 2010.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.M.; ORSOLANI, L.; MARTÍNEZ-YÉPEZ, A.; TAPIA M.S.; Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, n.5, p.808-813, 2010.

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.

GUNDUZ, G.T.; GONUL, S. A.; KARAPINAR, M. Efficacy of summac and oregan in inactivation of *Salmonella Typhimurium* on tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, n.3-4, p.39-44, 2010.

GUSMÃO, M.T.A.; GUSMÃO, S.A.L.; ARAÚJO, J.A.C. Produtividade de tomate tipo cereja cultivado em ambiente protegido e em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n.2, p. 431-436, 2006.

HORTIBRASIL. Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura. **O negócio de frutas e hortaliças frescas.** Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br/negocio.htm>>. Acesso: 20 mar 2011.

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

HUANG, Y.; CHEN, H. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. **Food Control**, v.22, n.8, p.1178-1183, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. São Paulo: IBGE, 2003. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/>> Acesso em: 10 jun. 2011.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.L.; KIM, H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.Y.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v.3, n.1, p. 95–101, 2007.

KODA, S.; MIYAMOTO, M.; TOMA, M.; MATSUOKA, T.; MAEBAYASHI, M. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.16, n.5 , p. 655–659, 2009.

LARA, H. H.; AYALA-NÚÑEZ, N.V. TURRENT, L. C. I. PADILLA, C. R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.4, p.615-621, 2010.

LAURY, A.M.; BROOKS, J.C.; ECHEVERRY, A.; BRASHEARS, M.M.;ALVARADO, M.C.; NACE, G. Validation of a lactic acid and citric acid acid based antimicrobial product for the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* on beef tips and whole chicken carcass. **Journal of Food Protection**, v.72, n.10, p.2280-2211, 2009.

LEE, S.Y.; BAEK, S.Y. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. **Food Microbiology**, v. 25, n.4, p. 582-587, 2008.

LEE, S.Y.; COSTELLO, M.; KANG, D.H. Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer of lettuce leaves. **Journal of Food Protection**, v. 67, n.6, p. 1371-1376, 2004.

LENUCCI, M. S.; CADINU, D. ; TAURINO, M.; PIRO, G.; DALESSANDRO, G. Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.7, p.2606-2613, 2006.

LEHTO, M.; KUISMA, R.; MÄÄTTÄ, J.; KYMÄLÄINEN, H.-R.; MÄKI, M. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. **Food Control**, v.22 n. 3–4, p. 469–475, 2011.

LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A.; SELMA, M.V.; GIL, M.I. Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, n.1, p.167-171, 2009.

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.

MAHMOUND, B.S.; LINTON, R.H. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on lettuce by chlorine dioxide gas. **Food Microbiology**, v.25, n.2, p.244-252, 2008.

MARRIOTT, N. G.; GRAVANI, R. B. **Principles of Food Sanitation**. Food Science. Text Series. 5th ed. New York, N.Y.: Springer, 2006.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.A.; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J.R.; RUÍZ, F. **Journal Nanoparticles Research**, v.10, n.1, p.1343–1348, 2008.

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, California, pp. 323–350, 2005.

MELO, P. C. T; VILELA, N. J. Desempenho da cadeia agroindustrial brasileira do tomate na década de 90. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p. 154-60, 2004.

MIRZAJANI, F.; GHASSEMPOUR, A.; ALIAHMADI, A.; ESMAEILI, M.A.; Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Research in Microbiology**, v.162, n.5, p.542-549, 2011.

MIZRACH, A. Ultrasonic technology for quality evaluation of fresh fruit and vegetables in pre- and postharvest processes. **Postharvest Biology Technology**, v.48, p.315–330, 2008.

MORETTI. C.L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília: Embrapa Frutas e Hortaliças e SEBRAE. 531p. 2007.

MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.B.; TAPIA RAMÍREZ, J.; YACAMAN, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v.16, p. 2346–2353, 2005.

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, L. C.; LIMA, L. C. O. ; PICOLLI, R. H.; FIORINI, J. E. ; DUARTE, S. M. S.; SILVA, J. M. S. F.; OLIVEIRA, N. M. S.; VEIGA, S. M. O. M.. Ozônio e ultrassom: processos alternativos para o tratamento do café despulpado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, p.282-294, 2008.

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.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v.25, n.5, p.722-776, 2002.

OLIVEIRA, A M C.; COSTA, J. M. C. da; MAIA, G. A. Qualidade higiênico-sanitária de abacaxi 'pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira Promoção da Saúde**, v. 19, n. 1, p. 19-24, 2006.

OLIVEIRA, A. M. C., **Estudo das características físico-químicas e microbiológicas de abacaxi (*Ananas comosus*), goiaba (*Psidium guajava* L.) e maracujá (*P. edulis* L.) minimamente processados**. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Water, sanitation and hygiene links to health. 2004. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/en/)>. Acesso em 10 jun 2011.

ONGENG, D.; DEVLIEGHIERE, F.; DEBEVERE, J.; COOSEMANS, J. RYCKEBOER, J. The efficacy of electrolysed oxidising water for inactivating spoilage microorganisms in process water and on minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p.187-197, 2006.

PAL, S., TAK, Y.K., SONG, J.M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n.2, p. 1712–1720, 2007.

PANACEK, A., KVITEK, L., PRUCEK, R., KOLAR, M., VECEROVA, R., PIZUROVA, N., SHARMA, V.K., NEVECNA, T., ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n.33, p.16248-16253, 2006.

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 from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2 (supplement), 2003.

PARK, E.J.; ALEXANDER, E.; TAYLOR, G.A.; COSTA, R.; KANG, D.H. The decontaminative effects of acidic electrolyzed water for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on green onions and tomatoes with differing organic demands. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 386-390, 2009.

PARK, S.H.; CHOI, M.; PARK, J.; PARK, K.; CHUNG, M.; RYU,S.; KANG, D. Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on Organic Fresh Apples and Lettuce. **Journal of Food Science**, v.0, n.0, p.m1-m6, 2011.

PATIL, S.; BOURKE, P.; KELLY, B.; FRÍAS, J. M.; CULLEN, P.J. The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, n.4, p.486-490, 2009.

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.

RAFFO, A.; LA MALFA, G.; FOGLIANO, V.; MAIANI, G.; QUAGLIA, G. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon*

*esculentum* cv. Naomi F1) **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.1, p.11-19, 2006.

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.

RAYBAUDI-MASSILA, R.M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; SABRINO-LÓPEZ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of malic acid and other quality stabilizing compounds to assure the safety of fresh-cut 'Fuji' apples by inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Safety**, v.29, n.1, p.236-252, 2009.

RAIDEN, R.M. **Efficacy of detergent rinse agents to remove *Salmonella* and *Shigella* spp. from the surface of fresh produce**. 2002. 80p. (Master of Science in Food Science and Technology). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v.82, p.632–639, 2003.

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.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C.; FRIAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M.; BARAT, J. M. Use of neutral electrolysed water (EW) for quality maintenance and shelf life extension of minimally processed lettuce. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n.1, p. 37-48, 2008.

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

ROMEO, F.V.; DE LUCA, S.; PISCOPO, A.; DE SALVO, E.; POIANA, M. Effect of some essential oils as natural food preservatives on commercial grated carrots. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n.3, p. 283-286, 2010.

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.

RUIZ-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.

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.

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.

SALLEH-MACK, S.Z.; ROBERTS, J.S. Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.14, n.3, p.323-329, 2007.

SAMELIS, J.; SOFOS, J.N. Organic acids. In: ROLLER, S. Editor, **Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods**, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, p. 98–132, 2003.

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

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

SÃO JOSÉ, J.F.B.; VANETTI, M.C.D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers on natural microbiota and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v.24, n.1-2, p.95-99, 2012.

SAXENA, A.; TRIPATHI, R.M.; ZAFAR, F.; SINGH, P. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. **Materials Letters**, v.67, p. 91–94, 2012.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Hortaliças Minimamente Processadas**. Estudos de Mercado SEBRAE/ESPM. Relatório Completo. 2008. 174p.

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.

SHARMA, V.K.; YNGARD, R.A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green Synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Sciences**, v. 145, n.4, p.83-96, 2009.

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 Environmental Microbiology**, v.78, n.19, p.6789-98, 2012.

SILVA, G. C. **Estudo do efeito do tipo de corte, adição de cloreto de cálcio e ácido ascórbico nas características físicas, físico-químicas e microbiológicas do abacaxi minimamente processado**. 2001. 120f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 177–182, 2004.

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.

SREBERNICH, S.M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos ao hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27. n. 4, p.744-750, 2007.

TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.A. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Control**, v.22, n.2, p.801-804, 2011.

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.

TOURNAS, V.H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, n.1, p.71-77, 2005.

TIWARI, D.K.; BEHARI, J. Biocidal nature of combined treatment of Ag-nanoparticle and ultrasonic irradiation in *Escherichia coli* DH5. **Advances in Biological Research**, v.3, n.3-4, p.89-95, 2009.

TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P.J. Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. **European Food Research Technology**, v.228, n.1, p.717-724, 2009.

TIWARI, B.K.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P.J.; O'DONNELL, C.P. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n.3, p.598-604, 2010.

UYTTENDAELE, M.; NEYTS, K.; VANDERSWALMEN, H.; NOTEBAERT, E.; DEBEVERE, J. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p. 263–271, 2004.

VALERO, M.; RECROSIO, N.; SAURA, D. ; MUÑOZ, N.; MARTY, N.; LIZAMA, V. Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 2, p.509–516, 2007.

VANDEKIDEREN, I.; CAMP, J.V.; DEVLIEGHERE, F.; VERAME, K.; DENON, Q.; RAGAERT, P.; DE MEULENAER, B. Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots (*Daucus carota* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.14, p. 5723-5731, 2008.

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

VIRTO, R.; SANZ, D.; ÁLVAREZ, I.; CONDÓN; RASO, J. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, i3. p.251– 257. 2005

WANG, Y.; BAO, Y.; SHEN, D.; FENG, W.; YU, T.; ZHANG, J.; ZHENG, X. D.; Biocontrol of *Alternaria alternation* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, n.3, p.234-239, 2008.

WOODS, C.W. 2004. **Examination of the effects of biosurfactant concentration on natural gas hydrate formation in seafloor porous media**. Thesis, Mississippi State University, Dave C. Swalm School of Chemical Engineering, 110p.

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.

ZHANG, Z.; KONG, F.; VARDHANABHUTI, B.; MUSTAPHA, A., LIN M. Detection of engineered silver nanoparticle contamination in pears. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.60, n. 43, p. 10762-10767, 2012.

ZHAO, Y.; TU, K.; TU S.; LIU, M.; SU, J.; HOU Y.P. A combination of heat treatment and *Pichia guilliermondii* prevents cherry tomato spoilage by fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.1, p.106-110, 2010.

ZHOU, B.; FENG, H.; LUO, Y. Ultrasound enhanced sanitizer efficacy in reduction of *Escherichia coli* O157:H7 population on spinach leaves. **Journal of Food Science**, v.74, n.6, m308–m313, 2009.

## CAPÍTULO 2

### **Efeito do tratamento com ultrassom, detergente a base de tensoativos, ácido láctico e nanopartículas de prata na inativação de células de *Salmonella enterica* Enteritidis aderidas à superfície de tomate cereja**

#### **RESUMO**

A sanitização é a etapa essencial para atribuir maior segurança e extensão da vida de prateleira de frutas e hortaliças. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com ultrassom (US), dicloroisocianurato de sódio (DCS), detergente a base de tensoativos (DET), ácido láctico (AL) e nanopartículas de prata (NP) na inativação de células de *Salmonella enterica* Enteritidis aderidas à superfície de tomate cereja. Primeiramente, avaliou-se a microbiota natural, a hidrofobicidade da superfície do tomate cereja e de *S. Enteritidis*, e a rugosidade do tomate cereja. As microscopias eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) foram utilizadas para visualizar o efeito dos tratamentos de sanitização na remoção do patógeno da superfície da hortaliça e verificar a ação destes sanitizantes na estrutura celular de *S. Enteritidis*. A presença de resíduos de prata após a sanitização com NP foi averiguada por MET associada a espectroscopia de energia dispersiva de raio X. Aplicadas de forma isolada e em associação com o US, as NP tiveram suas dimensões e estruturas avaliadas pela medida do raio hidrodinâmico e por MET. A avaliação da microbiota indicou ausência de *Salmonella* sp. e contagem de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, bactérias lácticas, *Pseudomonas* sp., psicrotóxicos aeróbios e coliformes a 35 °C igual a 4,06, 4,30, 3,41, 2,78, 4,28, 2,99 log UFC·g<sup>-1</sup>, respectivamente. A rugosidade média da superfície do tomate cereja foi 2,66 µm. A superfície de tomate cereja foi considerada hidrofóbica enquanto a *S. enterica* Enteritidis foi considerada hidrofílica. O processo de adesão de *S. Enteritidis* foi termodinamicamente desfavorável na superfície de tomate cereja. Apesar disso, a contaminação inicial de tomates cereja foi igual a 6,50 log UFC·g<sup>-1</sup>. Todos os tratamentos, exceto para DET, reduziram mais de um ciclo logarítmico a população do patógeno aderido à superfície do tomate. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos com DCS, AL, US, US + NP e US + DET que apresentaram redução de células aderidas de 1,54 a 1,80 log UFC·g<sup>-1</sup>. Maior número células de *S. Enteritidis* inativadas e, ou removidos foi observado após os tratamentos

com NP e com US + AL, que reduziram 2,29 e 2,37 log UFC·g<sup>-1</sup>, respectivamente. A MEV mostrou adesão de *S. Enteritidis* na superfície de tomate cereja e a remoção de células decorrente dos tratamentos de sanitização. A MET revelou que os tratamentos de US+AL, NP e US promoveram desestruturação da cápsula da célula bacteriana, sendo que no primeiro tratamento pôde ser observada ruptura da membrana celular. A medida do raio hidrodinâmico e a microscopia eletrônica de transmissão indicaram alteração da estrutura das NP após a associação com US e isto pode ter influenciado no efeito menos pronunciado na inativação microbiana. Entre as alternativas avaliadas neste estudo, observou-se maior redução de *S. Enteritidis* após o uso de nanopartículas de prata e ultrassom associados com ácido láctico. Estes resultados indicam que os tratamentos têm potencial para uso na sanitização de tomates cereja.

## 1. INTRODUÇÃO

Hortaliças cruas são geralmente contaminadas por uma variedade de micro-organismos. A microbiota contaminante na pós-colheita é consideravelmente diferente, refletindo as condições ambientais e de manuseio do alimento e pode comprometer a segurança do produto e a saúde do consumidor. Alguns dos micro-organismos patogênicos encontrados em produtos frescos e associados a surtos são *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, *Shigella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

A sanitização é uma etapa essencial para conferir maior segurança microbiológica e promover o aumento da vida de prateleira. As soluções cloradas são amplamente utilizadas na sanitização de frutas e hortaliças. Entretanto, há interesse na substituição do cloro devido à limitada redução de micro-organismos contaminantes na superfície de frutas e hortaliças e ainda, a possibilidade de formação de subprodutos tóxicos (trihalometanos) quando cloro reage com a matéria orgânica em fase de decomposição. Outro desafio para a indústria de alimentos é a capacidade de adesão de micro-organismos patogênicos, como *Salmonella*, a superfície de frutas e hortaliças, o que mostra a necessidade de estudos e de desenvolvimento de novas estratégias que colaborem para a segurança microbiológica.

Assim, sanitizantes e/ou novas tecnologias devem ser eficientes para a inativação de agentes patogênicos. O ultrassom é uma tecnologia que, nos últimos anos, tem sido estudada, com intuito de ganhar espaço e aplicação na indústria de alimentos. Esta alternativa pode ser utilizada para a remoção de partículas aderidas a superfícies e a inativação de micro-organismos. Há indícios que essa tecnologia associada à sanitizantes permita maior redução da contaminação microbiana de alimentos.

O uso de agentes detergentes/surfactantes tem aumentado na indústria de alimentos podendo ser utilizados em combinação com agentes físicos e químicos para aumentar a eficiência da sanitização.

Agentes antimicrobianos que podem ser empregados na etapa de sanitização são os ácidos orgânicos, são conhecidos pela capacidade de inativar patógenos presentes em alimentos. Em razão dessa característica, a aplicação de ácidos orgânicos como sanitizante em produtos frescos deve ser investigada.

Outra proposta que pode contribuir para o controle microbiológico de alimentos é a aplicação de nanopartículas de prata. A nanotecnologia tem se expandido em vários setores, e dentre eles, o de alimentos. As nanopartículas apresentam alto desempenho devido ao aumento da relação entre área superficial e volume, o que possibilita aumento na atividade antimicrobiana de nanopartículas de metais. Em razão da alta reatividade das nanopartículas e do conhecimento das propriedades antibacterianas da prata, pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar o potencial de aplicação como agentes bactericidas. Considerando a necessidade de ampliar as estratégias para a redução da contaminação em hortaliças e a indicação para aplicação do ultrassom, ácidos orgânicos, detergente a base de tensoativos e nanopartículas de prata como agentes sanitizantes, com este trabalho objetivou-se avaliar a influência de fatores físico-químicos, como rugosidade, hidrofobicidade, tensão interfacial e energia livre de interação hidrofóbica, relacionados à superfície de *S. Enteritidis* e de tomate cereja na adesão microbiana e avaliar o efeito do tratamento de ultrassom associado ou não ao ácido láctico, detergente a base de tensoativos e nanopartículas de prata em células de *S. Enteritidis* aderidas a superfície de tomates cereja.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Algumas análises foram feitas em outros laboratórios da mesma instituição: Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia, Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física e Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.1. Amostras de tomate cereja

As amostras de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) foram adquiridas em comércio varejista local, sendo acertado com o fornecedor que os tomates fossem originários do mesmo produtor para evitar variações. Em seguida, foram transportadas e armazenadas, sob refrigeração, a  $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por no máximo, 24 h, até o processamento e início das análises.

A seleção foi feita, descartando-se aqueles com má formação, danificados e, ou apodrecidos. Em seguida, foram lavados com água corrente para remoção das sujidades aderidas à superfície e drenados por 30 min em capela de fluxo laminar.

### 2.2. Avaliação da microbiota natural de tomate cereja

Amostras de 25 g de tomates foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1%. A homogeneização foi feita em *stomacher* (*Sweard Medical Co.*, Londres, Reino Unido), por 2 min, em velocidade normal. Diluições decimais apropriadas foram preparadas e alíquotas dessas diluições foram transferidas para meios de cultura específicos para a determinação de cada grupo microbiano. O plaqueamento das alíquotas foi realizado em duplicata e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por grama ( $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

### **2.2.1. Contagem de mesófilos aeróbios**

A determinação de mesófilos aeróbios foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade utilizando 1 mL das diluições previamente preparadas e em seguida, foi adicionado Ágar Padrão para Contagem (PCA, Himedia®), sendo as placas incubadas invertidas a 35 °C por 48 h (DOWNES e ITO, 2001).

### **2.2.2. Fungos filamentosos e leveduras**

A determinação de fungos filamentosos e leveduras foi realizada por plaqueamento em superfície em Ágar Batata Dextrose (BDA, Himedia®), acidificado e incubadas a 25 °C por 3 a 5 d (DOWNES e ITO, 2001).

### **2.2.3. Coliformes a 35 °C e *Escherichia coli***

A contagem de coliformes a 35 °C e *E. coli* foi realizada pela técnica de *Petrifilm*<sup>TM</sup> (3M®), segundo as recomendações da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h, enumerando-se como *E. coli* as colônias azuis com gás, e como coliformes a 35 °C, colônias vermelhas e azuis com gás.

### **2.2.4. *Pseudomonas* spp.**

A análise de *Pseudomonas* spp. foi realizada por plaqueamento em profundidade em Ágar Cetrimide (Himedia®), com incubação das placas a 28 °C por 48 h.

### **2.2.5. Psicotróficos aeróbios**

A determinação de psicotróficos aeróbios foi realizada por plaqueamento em superfície em Ágar Padrão para Contagem (Himedia®) com incubação das placas a 7 °C ± 1 °C por 7 a 10 d (DOWNES e ITO, 2001).

### **2.2.6. Bactérias lácticas**

A contagem de bactérias lácticas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, sendo adicionado 1 mL da amostra e derramando-se parte da quantidade de Ágar MRS (Himedia<sup>®</sup>), em placas de Petri. Após secagem do meio, foi adicionada sobrecamada do mesmo ágar, visando a criação de atmosfera de 15% de CO<sub>2</sub>, seguida de incubação a 30 °C por 5 d (DOWNES e ITO, 2001).

### **2.2.7. *Salmonella* sp.**

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada por meio da técnica ELFA em imunoanalisador Mini Vidas (Biolab BioMerieux) segundo *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

## **2.3. Caracterização da superfície do tomate cereja**

### **2.3.1. Rugosidade da superfície**

A microtopografia da superfície do tomate cereja foi avaliada com o uso do perfilômetro (XP1, Ambios Technology, Santa Cruz, CA, USA) no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV. A rugosidade foi expressa em micrômetros (µm).

### **2.3.2. Hidrofobicidade qualitativa, energia livre de interação hidrofóbica e energia livre de adesão**

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

As medidas de ângulos de contato da superfície de tomate cereja foram realizadas a 25 °C em três líquidos com diferentes polaridades, água, formamida (Vetec<sup>®</sup>) e  $\alpha$ -bromonaftaleno (Vetec<sup>®</sup>). Os ângulos de contato foram determinados pelo método da gota séssil (BUSSCHER *et al.*, 1984), usando goniômetro (Kruss-GmH, Hamburg) acoplado com analisador de imagem. As medições do ângulo de contato foram realizadas a cada segundo durante 15 s consecutivos a partir de uma

gota de água de 2,0 µL. A avaliação da superfície com os três líquidos foi realizada em triplicata e com três repetições.

A avaliação qualitativa da hidrofobicidade das superfícies foi determinada de acordo com Vogler (1998), que sugere para valores de ângulo de contato com a água inferior a 65° uma superfície hidrofílica, enquanto que para ângulo de contato superior a 65°, hidrofóbica.

Para medir o ângulo de contato da superfície das células de *S. enterica* Enteritidis, realizaram-se as medidas sobre uma camada de células vegetativas usando o método de gotas descrito por Busscher *et al.* (1990). A suspensão da bactéria foi depositada sobre um filtro de membrana de acetato celulose de 0,45 µm por filtração da suspensão usando pressão negativa. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) e 10% de glicerol (v/v).

A energia livre de interação hidrofóbica ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) foi calculada utilizando os componentes da tensão interfacial ( $\text{mN}/\text{m}$ ) das superfícies interatuantes (Equação 1).

$$(1 + \cos \theta)\gamma_l = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}) \quad (1)$$

Em que:  $\gamma_l$  é a tensão interfacial total do líquido;  $\gamma_l^{LW}$  é a tensão interfacial das forças de interações de Lifshitz-van der Waals;  $\gamma_l^+$  é a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons do componente ácido-base e  $\gamma_l^-$  é a tensão interfacial do componente doador de elétrons do componente ácido-base. Sendo *s* e *l* superfície e líquido, respectivamente.

Para se determinar as três componentes da tensão interfacial das superfícies das estirpes foi necessário determinar o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes, cujas componentes da tensão interfacial são conhecidos (Tabela 1). A tensão interfacial total  $\gamma_s^{\text{tot}}$ , resulta da soma de duas componentes ( $\gamma_s^{LW}$  e  $\gamma_s^{AB}$ ):

$$\gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos \theta_b)^2 \quad (2)$$

$$\gamma_s^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-}) \quad (3)$$

$$\gamma_s^{\text{TOT}} = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (4)$$

Em que:  $\gamma_s^{\text{TOT}}$  é a tensão interfacial total da superfície;  $\gamma_s^{LW}$  é a tensão interfacial das forças de interações de Lifshitz-van der Waals;  $\gamma_s^{AB}$  é a componente polar da

interação de ácido-base de Lewis;  $\gamma_s^+$  é a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons da componente ácido-base;  $\gamma_s^-$  é a tensão interfacial da componente doador de elétrons da componente ácido-base e  $\theta_B$  é o ângulo de contato formado com  $\alpha$ -bromonaftaleno.

Tabela 1 - Componentes da tensão de interfacial de líquidos a 25 °C.

Líquido	Tensão interfacial (mJ·m <sup>-2</sup> )			
	$\gamma_l^{\text{Tot}}$	$\gamma_l^{\text{LW}}$	$\gamma_l^+$	$\gamma_l^-$
$\alpha$ -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6

Fonte: VAN DER MEI *et al.*, 1998.

A energia livre de interação hidrofóbica  $\Delta G_{sas}^{\text{TOT}}$  entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w) é calculada pelo somatório das componentes apolar e polar da energia livre de interação,  $\Delta G_{sas}^{\text{LW}}$  e  $\Delta G_{sas}^{\text{AB}}$  respectivamente.

$$\Delta G_{sas}^{\text{TOT}} = \Delta G_{sas}^{\text{LW}} + \Delta G_{sas}^{\text{AB}} \quad (5)$$

$$\Delta G_{sas}^{\text{LW}} = -2(\sqrt{\gamma_s^{\text{LW}} - \gamma_a^{\text{LW}}}) \quad (6)$$

$$\Delta G_{sas}^{\text{AB}} = -4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_s^-}\right) \quad (7)$$

A partir dos valores das componentes da tensão interfacial é possível determinar a energia livre total de adesão entre duas superfícies ( $\Delta G_{adesão}$ ). Os valores das componentes das tensões interfaciais são determinados a partir dos valores coletados ou tabelados (Tabela 1), das tensões interfaciais das bactérias, das superfícies de adesão e do líquido em que estas duas superfícies se encontram imersas, que neste caso considera-se a água, por meio das seguintes equações definidas para um sistema bifásico de interação (bactéria/superfície) pela teoria termodinâmica:

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (8)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW} \gamma_s^{LW}} \quad (9)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_b^+ \gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^- \gamma_s^+}\right) \quad (10)$$

Em que  $\gamma_{bs}$  é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão,  $\gamma_{bl}$  é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido e  $\gamma_{sl}$  é a tensão interfacial entre as superfícies de adesão/líquido.

Como a energia livre está diretamente relacionada à tensão interfacial,  $\Delta G_{adesão}$  pode ser representado da seguinte forma (CHAVES, 2004):

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (11)$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (12)$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (13)$$

A energia livre de adesão ( $\Delta G_{adesão}$ ) entre as superfícies de tomate cereja e *Salmonella* Enteritidis, foi determinada para avaliar a influência destas na termodinâmica de adesão. O valor de  $\Delta G_{adesão}$  permite fazer uma avaliação termodinâmica do processo de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando  $\Delta G_{adesão} < 0$  e, ao contrário, desfavorável quando  $\Delta G_{adesão} > 0$ .

#### 2.4. Preparo dos sanitizantes

Foram avaliados os efeitos dos agentes sanitizantes: dicloroisocianurato de sódio Nippo Clor (Nippon®) na concentração igual a 200 mg·L<sup>-1</sup> (DCS), ácido láctico 1% (AL), solução de nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup> (NP), detergente a base de tensoativos Nitrol WV 2640 (Nippon®) (DET) associadas ou não ao ultrassom (US) de baixa frequência de 40 KHz (*Ultrasonic Cleaner* Branson® 1510, EUA). Como controles foram adotados o tratamento com água destilada esterilizada e o tratamento no qual os tomates cereja não foram submetidos à sanitização.

### **2.4.1. Síntese das nanopartículas de prata**

As dispersões coloidais foram obtidas de acordo com metodologia desenvolvida por Fernandes (2010). Foram preparadas dispersões de brometo de dodeciltrimetil amônia (DOTAB) (Aldrich®)  $3,12 \times 10^{-2}$  M, o que corresponde a 2 Concentração Micelar Crítica (CMC). Em seguida, foi preparada a dispersão nas proporções de 1 g de sulfadiazina de prata (Dermazine®) para cada 100 mL de DOTAB na concentração mencionada. As dispersões obtidas ficaram sob agitação constante por 3 h a 25 °C. Percorrido o tempo de agitação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804 R) a 4000 g por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e reservado para posterior utilização.

### **2.5. Avaliação da tensão interfacial e pH dos sanitizantes**

A tensão interfacial das soluções sanitizantes foi avaliada com o uso do goniômetro (Easy Drop, Krüss®). Foi efetuada uma medida a cada segundo durante 30 s da tensão interfacial pela técnica da gota pendente e pela equação de Young Laplace (ARASHIRO e DEMARQUETTE, 1999).

A determinação do valor de pH de cada sanitizante foi realizada em potenciômetro digital (Tradelab®). Para medir o pH foram utilizados 50 mL de cada sanitizante sendo realizada medidas em triplicata com 3 repetições.

### **2.6. Teste desafio dos procedimentos de sanitização: Avaliação da eficiência dos sanitizantes em células de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 por teste desafio**

Esse teste constituiu da avaliação do potencial dos diferentes sanitizantes para inativação da bactéria *S. Enteritidis* ATCC 13076, intencionalmente inoculada em tomates cereja frescos.

A etapa de sanitização consistiu na imersão de tomate cereja em solução sanitizante, por 5 min à temperatura de  $7 \pm 1$  °C. Todas as soluções sanitizantes preparadas foram mantidas a  $7 \pm 1$  °C para manutenção da temperatura.

Foram avaliados os efeitos dos agentes sanitizantes: dicloroisocianurato de sódio Nippo Clor (Nippon®) na concentração igual a  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (DCS), ácido láctico 1% (AL), solução de nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (NP), detergente a base de

tensoativos Nitrol WV 2640 (Nippon<sup>®</sup>) (DET) associadas ou não ao ultrassom (US) de baixa frequência de 40 KHz (Ultrasonic Cleaner Branson<sup>®</sup> 1510, EUA). Como controles foram adotados o tratamento com água destilada esterilizada e o tratamento no qual os tomates cereja não foram submetidos à sanitização.

### **2.6.1. Preparo das amostras**

Amostras de tomate cereja foram selecionadas e em seguida lavadas em água destilada esterilizada. Após a lavagem foram drenadas durante 10 min em capela de fluxo laminar.

### **2.6.2. Preparo do inóculo**

*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 foi obtida do estoque de cultura do laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

A cultura foi mantida em tubos Eppendorf de 1 mL contendo BHI (Difco<sup>™</sup>) à temperatura de -80 °C e foi feita sua ativação por duas repicagens consecutivas em BHI e incubada à 37 °C por 24 h até atingir a população de 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>.

### **2.6.3. Inoculação nos tomates cereja**

Foram colocados 200 g de tomates cereja em sacos plásticos previamente esterilizados e em seguida foi adicionado o inóculo (10 mL) juntamente com 1 L de água peptonada 0,1 %. O saco plástico, contendo o inóculo e a hortaliça, foi levemente agitado durante 5 min. Os tomates cereja foram mantidos em contato com a suspensão de células por 60 min à 25 ± 1 °C.

A suspensão de células foi drenada e os tomates cereja contaminados com *Salmonella* foram colocados em sacos plásticos esterilizados e incubados a 25 °C por 24 h para permitir maior adesão da bactéria.

Posteriormente, 200 g das amostras contaminadas foram imersas em 1 L de soluções de sanitização por 5 min a 7 ± 1 °C. Amostras não sanitizadas e amostras apenas lavadas em água destilada esterilizada foram consideradas como controles.

#### 2.6.4. Quantificação de células aderidas

Após cada tratamento, 25 g de amostras de tomates cereja foram transferidos para sacos plásticos esterilizados, contendo 225 mL de água peptonada 0,1 % e então, homogeneizados em *stomacher* (Marconi®) por dois minutos em velocidade normal. Em seguida, foi retirada alíquota de 1 mL para preparar as diluições decimais a serem plaqueadas pela técnica de espalhamento em superfície em ágar Hecktoen (Acumedia®). Após a incubação por 18 a 24 h, a 37 °C as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC·g<sup>-1</sup>.

Foi realizada ainda análise da solução de sanitização, sendo utilizada a mesma técnica e meio de cultura descritos anteriormente, após a sanitização para verificar se o tratamento aplicado promoveu remoção ou inativação das células de *Salmonella*.

Para neutralizar os agentes sanitizantes foram utilizados: solução de tiosulfato de sódio 0,05 M esterilizada (Isofar®) para neutralizar a solução de dicloroisocianurato de sódio; para neutralizar a ação do detergente a base de tensoativos Nitrol e nanopartículas de prata foi utilizada uma solução esterilizada a 3% de Tween 80 e para solução de ácido láctico 1 % foi utilizada solução esterilizada contendo 10 mL de fosfato de potássio monobásico (Isofar®), 34 g de hidróxido de sódio (Vetec, Brasil) com pH ajustado para 7,2, 30 ml Tween 80 e 5 g tiosulfato de sódio pentahidratado (Isofar®). Após a coleta das amostras das soluções sanitizantes, estas foram diluídas na respectiva solução neutralizante durante 1 min e, em seguida, procedeu-se as diluições e plaqueamentos em ágar Hektoen (Himedia®).

#### 2.6.5. Preparo dos cortes para observações microscópicas

O preparo dos tomates cereja foi realizado segundo item 2.6.1. Após a lavagem dos tomates cereja, foi retirada assepticamente a camada mais externa do tomate e feitos os cortes de 1,0 cm por 1,0 cm com auxílio de bisturi esterilizado. Os cortes foram dispostos em placas de Petri contendo água esterilizada para lavagem e remoção de resíduos do tecido vegetal.

Células de *Salmonella* foram cultivadas em caldo BHI por 16 h a 37 °C até atingir 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>. Após esta etapa, cortes de tomate cereja foram distribuídos em dois erlenmeyers contendo 100 mL de água peptonada 0,1%

esterilizada e adicionados de 1 mL do inóculo. Os cortes foram mantidos por 60 min a 25 °C em contato com a suspensão do inóculo. Após esse período, os cortes foram transferidos para placas de Petri esterilizadas e mantidos por 24 h a 25 °C.

Os cortes (n=10) foram distribuídos em sacos plásticos esterilizados com 100 mL de água destilada esterilizada por 1 min, para remoção de células planctônicas e, em seguida, foram submetidos aos tratamentos de sanitização descritos no item 2.6. Após os tratamentos de sanitização, os cortes foram submetidos às etapas de preparo para microscopia. As análises foram feitas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

#### **2.6.6. Microscopia eletrônica de varredura**

A microscopia foi realizada com o objetivo avaliar visualmente a superfície do tomate e o efeito de remoção dos sanitizantes sobre as células aderidas à superfície do tomate cereja.

Os cortes de tomate cereja para observação em microscópio eletrônico de varredura 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 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 ° Gay Lussak (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 (Critical Point Dryer – modelo CPD020, Balzers, Liechstenstein) para a desidratação total. Por último, foram metalizados em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechstenstein) para posterior observação ao microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP Zeiss, Cambridge, Inglaterra) e registro das imagens.

### **2.6.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Vinte mililitros de amostras de *Salmonella* sem tratamento e submetidas aos tratamentos de sanitização foram centrifugados (5000 g, 25 min a 4 °C) e, em seguida, foram lavadas duas vezes em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0. As células não tratadas foram consideradas como controle. Foram depositados 50 µL das suspensões bacterianas sobre suporte de grade de cobre e deixadas por 24 h a 25 °C para secagem. Em seguida, as grades de cobre foram levadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109, com voltagem de 80 kv e resolução teórica de 2 nm.

### **2.6.8. Avaliação da presença de resíduos de prata na superfície de tomate cereja por espectroscopia de energia dispersiva de raios X**

A espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X tem como objetivo avaliar composição química, caracterização e distribuição espacial de elementos químicos. Desta forma, cortes de 1 cm x 1 cm foram removidos da superfície de tomates cereja não tratados e tratados com nanopartículas de prata. Estes cortes foram submetidos às etapas de preparo de amostras para microscopia eletrônica de varredura descritas no item 2.6.6. Para esta análise, após a secagem ao ponto crítico, as amostras foram dispostas em evaporador de carbono Quorum Q150 T (Polaron, Quorum Technologies, Reino Unido) e em seguida foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP Zeiss, Cambridge, Inglaterra). As imagens obtidas foram submetidas a espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios para obtenção dos espectros e mapeamento da distribuição da prata na superfície dos tomates cereja.

### **2.6.9. Avaliação da alteração do tamanho das nanopartículas de prata após uso em associação com ultrassom por medida do raio hidrodinâmico e microscopia eletrônica de transmissão**

Para avaliação do tamanho das nanopartículas de prata, estas foram preparadas como descrito no item 2.4.1. e , em seguida, foram submetidas ao tratamento em ultrassom por 5 min.

O diâmetro das partículas em suspensão foi medido por espalhamento de luz dinâmico (Nanophox, Sympatec). O tamanho foi determinado em uma intensidade de laser de 50 %. Foram pipetados 400 µL da amostra para cada análise. Cada tamanho médio de partícula da suspensão foi determinado por experimentos que consistiram de três medidas simples com um tempo de medição de 300 s. Dessa forma, foi avaliada a alteração do tamanho das nanopartículas antes e após a utilização combinada ao ultrassom.

Para microscopia eletrônica de transmissão foram depositados 50µL das nanopartículas tratadas com ultrassom sobre suporte de grade de cobre e deixadas por 24 horas a 25 °C para secagem. Em seguida, as grades de cobre foram levadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109, com voltagem de 80 kv e resolução teórica de 2 nm. As nanopartículas não tratadas foram consideradas como controle.

## **2.7. Análises estatísticas**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo 8 tratamentos (dicloroisocianurato de sódio a 200 mg·L<sup>-1</sup>, detergente a base de tensoativos, ácido láctico 1%, nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup>, ultrassom 40 kHz, e ultrassom associado ao detergente a base de tensoativos, ultrassom associado a ácido láctico 1%, e ultrassom associado a nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup>) mais 2 tratamentos controle (não sanitizado e sanitizado com água esterilizada), sendo realizado para cada tratamento cinco repetições. A unidade experimental submetida a cada tratamento consistiu de 200 g de tomate cereja.

Os valores de rugosidade e hidrofobicidade das superfícies e pH e tensão interfacial dos sanitizantes, foram obtidos a partir de cinco replicatas e em três repetições. Em seguida, foram calculadas as médias e desvio padrão dessas medidas.

Os dados foram analisados com auxílio do *software* SAS, versão 9.1 (Statistical Analysis – SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos logaritmos do número de unidades formadoras de colônia por grama (log UFC·g<sup>-1</sup>) dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Avaliação da microbiota natural de tomate cereja

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de tomates utilizadas no experimento estão apresentados na Tabela 2. A Resolução nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), não prevê limites para a contagem de mesófilos aeróbios para hortaliças frescas *in natura*. No entanto, elevadas contagens de bactérias podem indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante a cadeia produtiva, como também dos potenciais riscos para a saúde do consumidor. Há indicações que alimentos com populações acima de  $6,0 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  podem apresentar alterações sensoriais, riscos de deteriorações, intoxicações e infecções, além da perda do valor nutricional, tornando-se, portanto, impróprio para o consumo humano (PRADO *et al.*, 2008).

**Tabela 2** – Média das contagens de micro-organismos ( $\log$  de  $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ )<sup>\*</sup> encontrados em tomate cerejas.

Micro-organismo	Log $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} \pm$ Desvio Padrão
Mesófilos aeróbios	$4,06 \pm 1,02$
Fungos filamentosos e leveduras	$4,30 \pm 0,76$
Bactérias lácticas	$3,41 \pm 0,89$
<i>Pseudomonas</i> sp.	$2,78 \pm 1,25$
Psicrotróficos aeróbios	$4,28 \pm 0,48$
Coliformes a 35 °C	$2,99 \pm 0,92$
<i>Escherichia coli</i>	< 2
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência/ 25 g

<sup>\*</sup>média das contagens obtidas a partir da análise de 10 amostras de tomate cereja adquiridas em comércio varejista local.

As amostras avaliadas apresentaram contagem de fungos filamentosos e leveduras acima de  $4 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ . Apesar da legislação não indicar limite para estes micro-organismos em hortaliças, Ferreira *et al.* (2002) estabeleceram contagem

inferior a 4 log UFC·g<sup>-1</sup> para garantir a proteção à saúde do consumidor, pois em contagens superiores pode haver produção de micotoxinas.

Não foi constatada a presença de *Salmonella* sp. nas amostras de tomate cereja. Desta forma, o tomate cereja avaliado estava adequado quanto aos padrões estabelecidos pela Resolução 12/2001 que prevê ausência deste patógeno em 25 g de amostra.

### 3.2. Caracterização da superfície do tomate cereja

#### 3.2.1. Rugosidade da superfície

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios referentes aos parâmetros Rugosidade Média (Ra) e Rugosidade Quadrática (Rq).

Tabela 3: Parâmetros de rugosidade das superfícies de tomate cereja medidos por perfilômetro.

Parâmetros	Tomate cereja (µm)
	Médias ± desvio padrão
Rugosidade Média (Ra)	2,66 ± 0,69
Rugosidade Quadrática Média (Rq)	3,38 ± 0,94

Ao observar a Figura 1 verifica-se que a superfície irregular do tomate cereja e, é constituída de fendas e protuberâncias. Quirynen e Bollen (1995) afirmaram que as irregularidades da superfície contribuem para um aumento da área superficial disponível para a adesão. Portanto, características inerentes à morfologia da superfície estudada podem influenciar a adesão de micro-organismos.

A rugosidade é um dos fatores relacionados a adesão de uma célula microbiana a uma superfície sólida (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004). O aumento no valor de Ra da superfície provoca maior retenção de micro-organismos nesta superfície (WHITEHEAD *et al.* 2004). Depressões e elevações na superfície tornam-se local para a colonização bacteriana e podem proteger as bactérias de forças de cisalhamento. No entanto, o acúmulo nestas depressões depende da dimensão da célula, tamanho e estágio do ciclo celular da bactéria. Estudos

realizados por Wang *et al* (2009) mostraram que há uma correlação linear positiva entre Ra e a taxa de adesão *E. coli* O157:H7 em superfícies de 4 tipos de frutas.

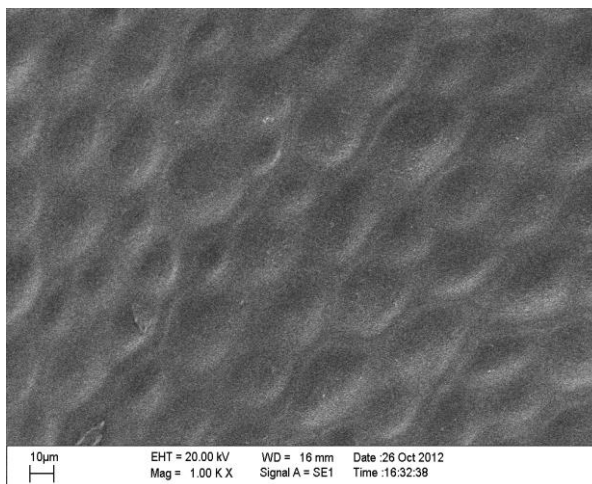


Figura 1 - Fotomicrografia da superfície de tomate cereja observada por Microscopia Eletrônica de Varredura.

A microtopografia da superfície pode aumentar ou diminuir a associação da bactéria à superfície. O aumento da adesão associada à rugosidade da superfície é atribuído à proteção das células no interior das irregularidades da superfície, permitindo que a adesão irreversível seja estabelecida com facilidade, sendo, por isso, pontos preferenciais para a colonização inicial (ARAÚJO *et al.*, 2010).

### **3.2.2. Hidrofobicidade qualitativa, energia livre de interação hidrofóbica e energia livre de adesão**

Pela análise qualitativa, observando-se os valores dos ângulos de contato (Tabela 4) verificou-se que as superfícies de tomate cereja foram consideradas hidrofóbicas, pois apresentaram ângulo de contato com a água superior a 65°. *S. enterica* Enteritidis foi considerada hidrofílica, por apresentar ângulo de contato com a água inferior a 65°. Este resultado está em conformidade com os de Oliveira *et al.* (2006) que verificaram que cinco estirpes de *S. enterica* Enteritidis apresentaram valores de ângulo de contato com a água entre 9,7 e 14° e portanto foram classificadas como hidrofílicas. Esse resultado está em conformidade com o encontrado nesse experimento, em que apesar do ângulo de contato formado entre *S. enterica* Enteritidis e a água ter sido superior aos verificados por esses autores, tal valor também indica que esse patógeno é hidrofílico.

Tabela 4: Valores médios dos ângulos de contato ( $\theta$ ) determinados a temperatura ambiente sobre as superfícies de tomate cereja e de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076, com água ( $\theta_w$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ).

Superfícies	Ângulo de contato ( $^\circ$ )		
	$\theta_w$	$\theta_F$	$\theta_B$
Tomate Cereja	69,33	68,06	48,59
S. Enteritidis	15,98	22,64	52,47

Pela análise quantitativa da hidrofobicidade, a superfície de *S. Enteritidis* foi considerada hidrofílica, enquanto a de tomate cereja foi considerada hidrofóbica (Tabela 5). De acordo com van Oss e Giese (1995), quando o valor de  $\Delta G_{\text{sas}}^{\text{TOT}}$  é negativo, a superfície é considerada hidrofóbica, e ao contrário, a superfície é considerada hidrofílica. Estes resultados corroboram com os obtidos na análise qualitativa da hidrofobicidade.

Tabela 5: Valores médios de  $\Delta G^{\text{LW}}$ ,  $\Delta G^{\text{AB}}$  e  $\Delta G^{\text{total}}$ .

Amostra	$\Delta G^{\text{LW}}$ ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )	$\Delta G^{\text{AB}}$ ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )	$\Delta G^{\text{total}}$ ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )
Tomate cereja	-1,501	-57,978	-59,299
S. Enteritidis	-0,958	31,428	30,470

Os micro-organismos podem apresentar características hidrofóbicas ou hidrofílicas. Essa variação é decorrente da interação dos grupos apolares e polares presentes na parede microbiana (BOTERO *et al.*, 2008). A caracterização termodinâmica da superfície bacteriana é um reflexo das características físico-químicas da superfície, que são definidas por componentes macromoleculares, como lipopolissacarídeos, proteínas e exopolímeros, que variam em quantidade com as condições de crescimento e de estirpe para estirpe (STREVETT e CHEN, 2003).

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são forças físico-químicas envolvidas na aderência de micro-organismos às superfícies sólidas. As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos micro-organismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas do que às hidrofílicas. Acredita-se que interações hidrofóbicas

apresentam papel relevante na adesão de micro-organismos, tanto em superfícies inertes para processamento de alimentos, quanto em superfícies de alimentos, como a carne (FIGUEIREDO, 2000).

O valor de  $\Delta G_{adesão}$  foi igual a  $0,8386 \text{ mJ}\cdot\text{m}^2$ . De acordo com a teoria termodinâmica, a adesão é favorecida se a variação da energia livre por unidade de área da superfície for negativa, o que significa que a adesão espontânea é acompanhada por uma diminuição da energia livre do sistema, como previsto pela Segunda Lei da Termodinâmica. Dessa forma, o processo de adesão de *S. enterica* Enteritidis foi, teoricamente, termodinamicamente desfavorável na superfície de tomate cereja.

É sabido que em solução aquosa, a adesão pode ser favorável entre superfícies hidrofóbicas, uma vez que a camada de água que reveste as duas superfícies é removida. Entretanto, pode ocorrer adesão entre superfície hidrofóbica e outra hidrofílica ou entre duas superfícies hidrofílicas (VAN OSS, 1997). A rugosidade pode contribuir mais para a adesão do que a hidrofobicidade da superfície do tomate, pois a aderência pode ser facilitada pela área de contato aumentada entre os micro-organismos e a superfície (LIMA *et al.*, 2013).

Apesar de que pesquisas sobre a adesão na superfície de hortaliças e frutas serem escassas, sabe-se que a secreção de mucilagem, que contém açúcar e proteínas, favorece também o crescimento de bactérias nas superfícies vegetais (BRANDL e AMUNDSON, 2008).

### **3.3. Avaliação da tensão interfacial e pH dos sanitizantes**

Na Tabela 6 estão apresentados os valores médios da tensão interfacial dos sanitizantes utilizados na etapa de sanitização de tomate cereja.

Os menores valores de tensão superficial foram observados na solução com detergente a base de tensoativos e com nanopartículas de prata. Sabe-se que ambos são compostos por agentes surfactantes e, deste modo, podem reduzir a tensão interfacial de um líquido. Além disso, eles podem atuar como agentes molhantes, emulsionantes, agentes de formação de espuma e dispersantes. Tensoativos contêm tanto um grupo hidrofílico e um grupo hidrofóbico, o qual interage com a substância com que estão misturados com o fim de alterar as propriedades de superfície da água, quer na interface de água e ar ou na interface água e sólido. Devido a estas

propriedades, surfactantes/detergentes podem facilitar a remoção de patógenos da superfície de produtos frescos, como o tomate cereja.

Tabela 6 - Tensão interfacial ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) dos sanitizantes utilizados no experimento.

<b>Sanitizante</b>	<b>Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>
Água destilada	70,86 <sup>a</sup> $\pm$ 0,84
DCS 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	69,66 <sup>a</sup> $\pm$ 0,60
AL 1 %	59,85 <sup>b</sup> $\pm$ 1,25
DET	26,07 <sup>c</sup> $\pm$ 0,75
NP 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	39,39 <sup>d</sup> $\pm$ 0,51

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna não diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

O valor de pH dos sanitizantes utilizados está disposto na Tabela 7.

Tabela 7 – Valor de pH dos sanitizantes utilizados no experimento.

<b>Sanitizante</b>	<b>Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>
Água destilada	6,51 <sup>a</sup> $\pm$ 0,22
DCS 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6,11 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01
AL 1 %	2,62 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01
DET	10,11 <sup>d</sup> $\pm$ 0,08
NP 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	8,16 <sup>e</sup> $\pm$ 0,04

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna não diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

A solução de AL 1 % apresentou o menor valor de pH dentre os sanitizantes avaliados. Além da importância da escolha do sanitizante mais apropriado para determinado alimento, o controle do pH na solução de sanitização é fundamental para a eficiência da operação (LUND *et al.*, 2005).

### **3.4. Avaliação do efeito dos tratamentos sanitizantes em *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076**

O número inicial de células de *Salmonella* aderidas aos tomates cereja foi igual a  $6,50 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ . A adesão de micro-organismos à superfície de frutas e hortaliças evidencia a possibilidade de multiplicação microbiana durante a estocagem e ainda, sugere a chance de que células do patógeno permaneçam em sítios protegidos na superfície vegetal ou em biofilmes pré-existentes.

Todos os tratamentos, exceto com o detergente a base de tensoativos, promoveram redução de mais de um ciclo logarítmico (Tabela 8) de *S. Enteritidis*.

Tensoativos que consistem em moléculas anfipáticas podem reduzir a tensão interfacial. Com base na mesma teoria, os agentes tensoativos podem causar uma diminuição de interações hidrofóbicas que estão envolvidas na fixação bacteriana (SAGONG *et al.*, 2013). Diversos estudos têm sido feitos para avaliar a eficiência dos detergentes na remoção de patógenos de frutas e hortaliças (HASSAN e FRANK, 2003; RAIDEN *et al.*, 2003; KESKINEN E ANNOUS, 2011). O uso de Tween 85 foi capaz de remover mais *E. coli* O157: H7 da superfície de alface do que a água usada isoladamente, com uma diferença de  $0,48 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^2$  entre os dois tratamentos (HASSAN e FRANK, 2003). Por outro lado, Keskinen e Annous (2011) avaliaram a adição de detergentes a tratamentos de sanitização e não observaram alteração da eficiência de cloro, solução de dióxido de cloro, ou de água deionizada ao tratar alfaces Romaine. Resultado semelhante foi obtido por Raiden *et al.* (2003), que também mostraram que detergentes não melhoraram a remoção de células bacterianas de produtos frescos.

Segundo Kesken e Annous (2011), a adição de surfactantes a solução sanitizante não foi capaz de auxiliar na penetração do biofilme, a fim de inativar as células bacterianas. Sagong *et al.* (2013) verificaram que o uso de agente físico combinado ao uso do detergente/surfactante pode contribuir para remoção das células bacterianas aderidas a superfície. No presente estudo, a combinação de ultrassom e detergente promoveu maior redução de células de *S. Enteritidis* aderidas a superfície de tomate cereja do que o uso isolado da solução detergente. O ultrassom, devido ao fenômeno de cavitação libera energia mecânica de forma a facilitar o contato dos agentes detergentes com a superfície que será higienizada. Além disso, o tempo de tratamento igual a 5 min pode revelar-se benéfico para

permitir contato e acesso às células aderidas e inativá-las.

Tabela 8 – Efeito dos tratamentos de sanitização a 7 °C durante 5 min na redução da população de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 em tomates cereja.

<b>Tratamento</b>	<b>Log UFC·g<sup>-1</sup>*</b>	<b>Redução Log UFC·g<sup>-1</sup></b>
Não sanitizado	6,50 <sup>a</sup> ± 0,36	-
Água destilada esterilizada	6,11 <sup>a</sup> ± 0,24	0,39
DCS 200 mg·L <sup>-1</sup>	4,95 <sup>c</sup> ± 0,28	1,54
DET	5,62 <sup>b</sup> ± 0,14	0,88
AL 1%	4,78 <sup>c</sup> ± 0,38	1,72
NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	4,20 <sup>d</sup> ± 0,31	2,29
US 40 kHz	5,05 <sup>c</sup> ± 0,37	1,45
US 40 kHz + DET	4,90 <sup>c</sup> ± 0,21	1,60
US 40 kHz + AL 1%	4,13 <sup>d</sup> ± 0,14	2,37
US 40 kHz + NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	4,69 <sup>c</sup> ± 0,12	1,80

\* Médias ± Desvio Padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si (p>0,05).

Não houve diferença significativa (p>0,05) entre os valores médios de redução log UFC·g<sup>-1</sup> após os tratamentos com DCS 200 mg·L<sup>-1</sup>, AL 1 %, US 40 kHz, US 40 kHz associado com NP 6 mg·L<sup>-1</sup> e de ultrassom associado com detergente a base de tensoativos. Isto mostra que os tratamentos propostos para sanitização de tomate cereja podem ser aplicados em substituição aos compostos clorados. Sabe-se que há preocupação quanto ao uso destes agentes químicos devido a possibilidade de reação com a matéria orgânica o que resulta em concentrações elevadas de trihalometanos e outros subprodutos da desinfecção que são tóxicos (RAHMAN *et al.*, 2011; SÃO JOSÉ e VANETTI, 2012) e também em razão do insucesso no controle de bactérias patogênicas (SAGONG *et al.*, 2011). Além disso, alguns sanitizantes, como compostos clorados, não são permitidos no processamento de alimentos orgânicos e há um interesse crescente por parte dos consumidores em consumir alimentos com redução de aditivos químicos (SAGONG *et al.*, 2011).

O tratamento com ácido láctico 1 % mostrou-se efetivo para remoção da contaminação de *S. enterica* Enteritidis sendo sua redução de 1,72 log UFC·g<sup>-1</sup> maior que o resultado obtido por Sagong *et al.*(2011) que ao usar a mesma concentração de ácido láctico e o mesmo tempo de sanitização reduziu 1,39 log UFC·g<sup>-1</sup> de *S. Typhimurium* em alface. O ácido láctico é um composto natural que é GRAS (geralmente reconhecido como seguro) e tem potencial para aplicação na sanitização de frutas e hortaliças (HUANG e CHEN, 2011). Este ácido orgânico tem importante efeito inibitório em bactérias gram-negativas, sendo sua atividade antimicrobiana relacionada principalmente a processos de estresse oxidativo, rompimento de membrana e acúmulo de ânions tóxicos no interior da célula (TAJKARIMI e IBRAHIM, 2011). O mecanismo antimicrobiano pelo qual os ácidos orgânicos agem está relacionado a redução do pH do ambiente, a alteração do equilíbrio do sistema de transporte da membrana da célula e permeabilidade, acúmulo de íons e redução do pH interno pela dissociação de íons hidrogênio (ALAKOMI *et al.*, 2000; IBRAHIM *et al.*, 2008; SAGONG *et al.*, 2011; HUANG e CHEN, 2011; NEAL *et al.*, 2012).

Ao aplicar ácidos orgânicos de forma isolada em diferentes concentrações, Sagong *et al.* (2011) observaram que os ácidos orgânicos avaliados, incluindo o ácido láctico, produziram reduções consideráveis na população de *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* em alface.

Neal *et al.* (2012) aplicaram ácido láctico 2 % por 30 s à 55 °C em folhas de espinafre por meio de pulverização e observaram redução da contagem de *Salmonella* em 2,3 log UFC·g<sup>-1</sup>. A aplicação de ácido láctico nas concentrações entre 0,3 % e 4 % mostrou-se eficiente na redução in vitro de *Y. enterocolitica* (VIRTO *et al.*, 2005). Akbas e Olmez (2007) obtiveram reduções em torno de 2 log UFC·g<sup>-1</sup> e 1,5 log UFC·g<sup>-1</sup> para a *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente, após tratamento de alface minimamente processado por imersão em 0,5 % de ácido láctico. Velázquez *et al.* (2009), apesar de utilizarem ácido láctico 0,2 %, para evitar alterações da aparência, cheiro ou odor das hortaliças, esta concentração ocasionou 5,08 reduções log UFC·g<sup>-1</sup> de *Y. enterocolitica* em tomates. Em contraste, ácido láctico a 1 % provocou redução igual a 1,71 log UFC·g<sup>-1</sup> para *E. coli* O157: H7 em alface. Estes dados indicam que há variação no efeito do tratamento aplicado de acordo com o micro-organismo inoculado, tipo de hortaliça sanitizada e tempo decorrido após a sanitização até o consumo.

A combinação de ultrassom e ácido láctico 1 % promoveu 2,37 log UFC·g<sup>-1</sup> de redução dentre os tratamentos avaliados. A redução provocada por este tratamento corroborou com resultados obtidos por Sagong *et al.* (2011) que ao sanitizar alface contaminada com *S. Typhimurium* com ultrassom associado a ácido láctico 1 % por 5 min constataram redução de 2,33 log UFC·g<sup>-1</sup>. Apesar de ter sido observado aumento do efeito na sanitização utilizando ácido láctico e ultrassom, não foi observado efeito sinérgico.

Diversos trabalhos na literatura (GOGATE e KABADI, 2009; SAGONG *et al.*, 2011; SÃO JOSÉ e VANETTI, 2012) indicam que o ultrassom pode auxiliar os sanitizantes a penetrar em locais antes considerados inacessíveis (camadas hidrofóbicas, dobras e ranhuras em superfícies de folhas, frutas e hortaliças) e assim contribuir para aumento da eficiência da solução de sanitização. A pressão intensa gerada durante a utilização de ultrassom pode contribuir para a penetração dos oxidantes químicos através da membrana celular e do processo de cavitação pode auxiliar a desagregação dos micro-organismos, que culmina com uma maior eficiência do tratamento de sanitização.

Sagong *et al.* (2011) observaram que o tratamento ultrassom combinado a ácidos orgânicos durante 5 min provocou redução adicional de 0,8-1,0 log UFC·g<sup>-1</sup> de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, e *L. monocytogenes* em comparação com o tratamento com ácido orgânico por si só. Ainda de acordo com estes autores, a redução promovida pela aplicação do ultrassom, entre 5 e 10 min de tratamento não foram significativamente diferentes o que sugeriu que a redução da contagem provocada pelo ultrassom ocorreu principalmente durante primeiros 5 min e não aumentou significativamente mesmo após 10 min de tratamento.

O tempo reduzido para sanitização é essencial na linha de processamento mínimo de frutas e hortaliças. Tratamentos com ultrassom em período maior que 30 min podem afetar a aparência geral e textura, assim, este tratamento precisa ser adequado como uma prática efetiva de alimentos a curto tempo de processamento para inativação e remoção de agentes patogênicos em combinação com outros métodos de controle, tais como calor, pressão e soluções sanitizantes (RASO *et al.*, 1998; SAGONG *et al.*, 2011).

A aplicação do ultrassom isolado não diferiu estatisticamente dos tratamentos com ácido láctico 1 %, ultrassom associado ao detergente, ultrassom associado às nanopartículas de prata e ao dicloroisocianurato de sódio. Este resultado é

interessante no sentido que a aplicação somente de ultrassom, nas condições experimentais estabelecidas, promoveu redução da contagem de *S. Enteritidis* sem ser necessária a adição de algum agente químico ao processo de sanitização. Este fato tem atraído atenção para aplicação desta tecnologia, considerada como tecnologia verde, por possuir papel na sustentabilidade do meio ambiente e por não provocar danos (CHEMAT *et al.*, 2011).

Sagong *et al.* (2011) obtiveram reduções de 1,8-1,9 log UFC·g<sup>-1</sup> das contagens de *E. coli* O157: H7, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* em alface orgânica após tratamento com ultrassom durante 60 min. Este resultado indicou que o tratamento com ultrassom sozinho pode não ser adequado para utilização na indústria de alimentos devido ao baixo efeito e necessidade de longo período de tratamento para provocar maior remoção/inativação de micro-organismos. Sengul *et al.* (2011) também sugere que o ultrassom tem potencial para ser usado para o inativação de bactérias, mas por si só, não é eficaz para inativar micro-organismos em alimentos à temperatura ambiente ou a temperaturas subletais. Vários estudos como o Seymour *et al.* (2002) relataram que a redução da contagem de *S. Typhimurium* em alface foi de 2,7 log UFC·g<sup>-1</sup> após o tratamento combinado e ultrassom de 100 mg ·L<sup>-1</sup> de água clorada, o que ocasionou uma redução adicional de um ciclo logarítmico em comparação com o tratamento de ultrassom ou água clorada sozinho por 10 minutos. São José e Vanetti (2012) observaram que o tratamento combinado entre ultrassom 40 kHz e ácido peracético 40 mg·L<sup>-1</sup>, por 10 min, promoveu remoção 4 log UFC·g<sup>-1</sup> de *S. Typhimurium* aderida a superfície de tomates cereja.

Scouten and Beuchat (2002) observaram que a combinação de ultrassom com Ca(OH)<sub>2</sub> pode ser uma alternativa para descontaminação de brotos de alfafa contaminados com *Salmonella* e *E. coli* O157: H7. Maçãs tratadas com ultrassom 170 kHz combinado com dióxido de cloro 20 mg·L<sup>-1</sup> reduziu a população de *Salmonella* e *E. coli* O157: H7 em até 4 log UFC·g<sup>-1</sup> (HUANG *et al.*, 2006).

Zhou *et al.* (2009) observaram que o uso do ultrassom contribuiu para redução adicional de 0,7 a 1,1 log UFC·g<sup>-1</sup> de *E. coli* O157: H7 em espinafre em todos tratamentos, e superou o resultado obtido pelos sanitizantes aplicados sozinhos. Tratamentos sequenciais como o aplicado por Ayyildiz *et al.* (2011) observaram que a combinação sequencial de ultrassom e dióxido de cloro provocou redução de 3,2 - 3,5 log UFC·mL<sup>-1</sup> na contagem de *E. coli* e coliformes totais na água de lavagem,

enquanto a soma das reduções produzidas pelos tratamentos individuais foi 1,4-1,9 log UFC·mL<sup>-1</sup>.

Nanopartículas de prata e o ácido láctico combinado com o ultrassom, apresentaram os melhores efeitos na sanitização de tomate cereja, alcançando 2,29 e 2,37 log UFC·g<sup>-1</sup>, respectivamente.

As nanopartículas de prata possuem diferentes aplicações como catálise em reações químicas e inativação microbiana (CHOI *et al.*, 2008). Devido suas propriedades antimicrobianas eficazes, as nanopartículas de prata tornaram-se um dos nanomateriais mais comumente usados (MAYNARD *et al.*, 2006). O efeito inibitório de Ag<sup>+</sup> pode estar relacionado a sua adsorção à parede celular bacteriana carregada negativamente, desativação de enzimas celulares, perturbando a permeabilidade da membrana e, em última análise, conduzindo à lise celular e morte (SAMBHY *et al.*, 2006).

A combinação ultrassom e nanopartículas de prata não apresentou efeito sinérgico e, de forma contrária aos demais sanitizantes aplicados em combinação com o ultrassom, apresentou menor inativação do que somente nanopartículas de prata. Tiwari e Behari (2009) relataram que a aplicação do ultrassom garante a entrada das nanopartículas de prata na célula bacteriana, na qual ocorre inicialmente a ligação com vários sítios na membrana e parede celular.

A menor inativação observada no tratamento ultrassom associado a nanopartículas de prata foi inesperado pois sabe-se que o ultrassom auxilia no transporte de pequenas moléculas em solução pelo aumento da movimentação do fluido. Este resultado pode ser explicado pela alteração de tamanho das nanopartículas de prata após o tratamento combinado com ultrassom. A ligação das partículas à bactérias depende da área de superfície disponível para a interação. As partículas menores com a maior área de superfície disponível para interação promovem maior efeito bactericida do que partículas de maior tamanho (PANACEK *et al.*, 2006).

A combinação nanopartículas de prata e ultrassom 40 kHz provocou a redução de 1,9 log UFC·g<sup>-1</sup>, ou seja, aproximadamente 99 % da população de *S. Enteritidis* nas amostras de tomate cereja. Este resultado foi melhor ao observado por Tiwari e Behari (2009) que ao tratar células de *E. coli* DH5 com 135 kHz durante 15 min em solução de nanopartículas com 25 µg·mL<sup>-1</sup> verificaram 50 % da perda de viabilidade e esta perda foi igual a 40 % quando as células foram tratadas com

ultrassom a 35 kHz associado as nanopartículas. Chamakura *et al.* (2011) compararam o efeito bactericida de nanopartículas de prata com sanitizantes comumente utilizados e observaram que estas nanopartículas têm efeito bactericida mais lento e mecanismo de inativação que envolve várias etapas que incluem dano na parede celular e na membrana citoplasmática.

Gopal *et al.* (2010), ao sanitizar alface com água contendo  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de prata observou 50 % de redução na contagem de enterobactérias e considerou que esta família parece ser muito sensível à prata mesmo em concentrações baixas.

Apesar do efeito expressivo na inativação de micro-organismos presentes em tomate cereja, segundo Gopal *et al.* (2010), regulamentações e aceitação do consumidor são fatores críticos na aplicação potencial de novas tecnologias. Dessa forma, é importante avaliações complementares que forneçam informações que permitirão a inclusão segura destes novos tratamentos de sanitização na linha de processamento de indústrias de frutas e hortaliças.

#### **3.4.1. Avaliação do efeito dos tratamentos sanitizantes em *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076 presente na solução após a sanitização**

Nos tratamentos em que foi associado o ultrassom ao ácido láctico e ultrassom as nanopartículas de prata, foi verificada ausência de *S. enterica* Enteritidis nas soluções após a sanitização. A inativação do patógeno provavelmente foi causada pela ação dos agentes químicos, pois observou-se que ação do ultrassom promoveu remoção das células aderidas ao tomate cereja.

Ao considerar a adesão inicial igual  $6,5 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  e a contagem de *S. enterica* Enteritidis nas soluções de sanitização após os diferentes tratamentos (Tabela 9), observa-se que o tratamento de ultrassom promoveu remoção e inativação da contaminação do patógeno. Destaca-se a aplicação de agentes químicos, como ácido láctico e nanopartículas de prata que reduziram a população de contaminantes a níveis não detectáveis pela técnica empregada.

A avaliação da presença de *S. enterica* Enteritidis nas soluções sanitizantes utilizadas visa averiguar a possibilidade de ocorrência de contaminação cruzada após a sanitização em casos em que a água de lavagem/sanitização seja reutilizada no processamento. Foram observadas contagens entre 5,06 a 6,48  $\text{log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  na solução sanitizante contendo a dicloroisocianurato de sódio, detergente a base de

tensoativos, ou submetido ao ultrassom e ultrassom combinado ao detergente ( $p > 0,05$ ). Dessa forma, esses tratamentos tornam-se um risco para ocorrência de contaminação cruzada.

Tabela 9 - População de *S. enterica* Enteritidis recuperadas das soluções sanitizantes após os tratamentos por 5 min a 7 °C.

<b>Tratamento</b>	<b>Contagem Log UFC·mL<sup>-1</sup>*</b>
DCS 200 mg·L <sup>-1</sup>	4,84b ± 0,72
DET	6,48a ± 0,51
AL 1 %	Nd
NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	Nd
US 40 kHz	5,28b ± 0,64
US 40 kHz + DET	5,06b ± 0,49
US 40 kHz + AL 1 %	Nd
US 40 kHz + NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	Nd

\* Médias ± Desvio Padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Nd = população de *S. enterica* Enteritidis abaixo do limite de detecção da técnica aplicada (1 UFC · ml<sup>-1</sup>).

Devido a fatores econômicos e ambientais, o condicionamento e a reciclagem de água tem sido uma prática muito utilizada para a indústria e é atualmente recomendado por instituições governamentais (FDA, 2008). Assim, a água de lavagem também pode causar a contaminação cruzada dentro de um lote e entre os lotes lavados sequencialmente. A utilização eficiente de sanitizantes químicos durante a etapa de lavagem e sanitização é um ponto crítico para manter a qualidade e segurança de frutas e hortaliças frescas (TOMÁS-CALLEJAS *et al.*, 2012). Deste modo, o uso de agentes sanitizantes pode reduzir a carga de micro-organismos patogênicos presentes no tecido vegetal, mas a sua inativação completa não é possível (ALLENDE *et al.*, 2008).

A ausência de *S. enterica* Enteritidis na solução de tratamento com nanopartículas de prata e ácido láctico indica que a solução de tratamento é eficaz na inativação de micro-organismos e reduz os riscos de contaminação cruzada. É de grande importância testar diferentes soluções sanitizantes considerando a sua

capacidade para evitar a contaminação cruzada, em condições similares às aquelas encontradas na indústria (GONZALEZ *et al.*, 2004). O controle da qualidade de água após o processamento das frutas e hortaliças é importante para minimizar o risco de contaminação cruzada e manter a qualidade de água que será destinada ao ambiente.

### 3.4.2. Avaliação do efeito dos tratamentos sanitizantes em *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076 por Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 2 ilustra a adesão de *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076 a superfície de tomate cereja e o efeito da água na remoção de células aderidas.

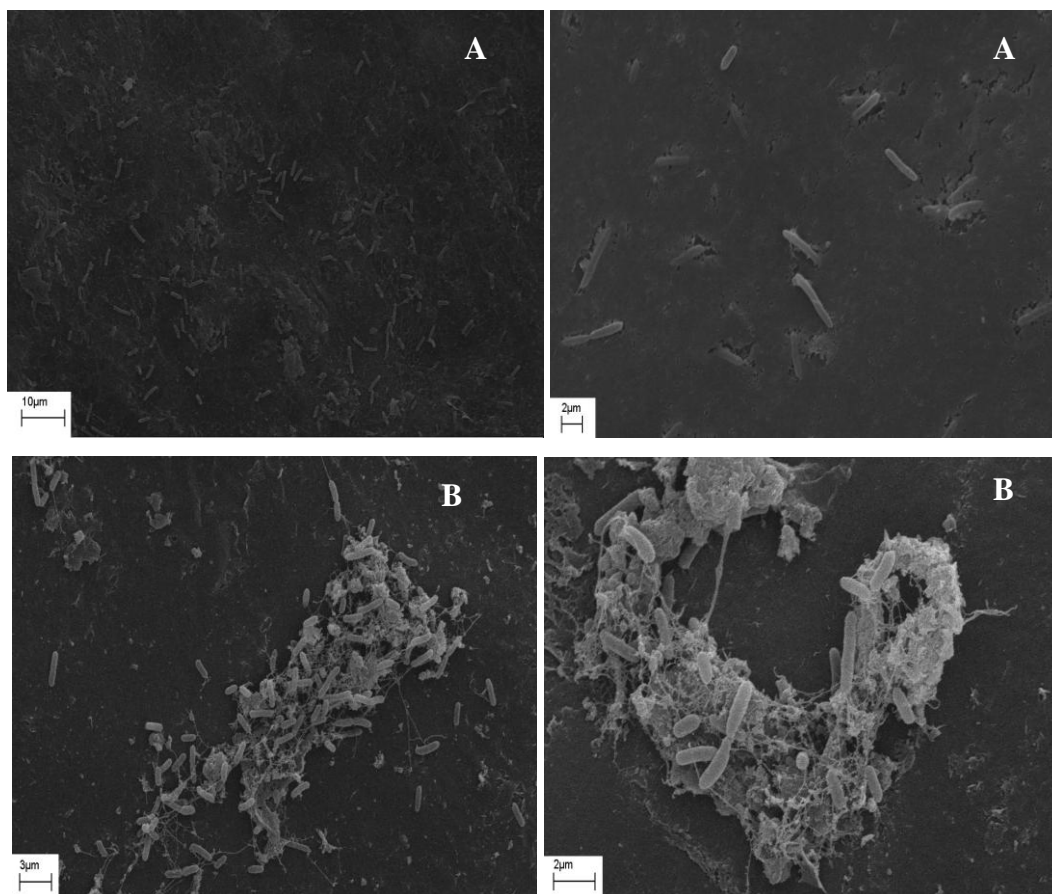


Figura 2 - Fotomicrografias de células de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 aderidas à superfície de tomate cereja observada por microscopia eletrônica de varredura: Não sanitizado (A), após sanitização por imersão em água destilada esterilizada por 5 minutos (B).

A adesão observada nas imagens A das fotomicrografias evidencia a capacidade de *Salmonella* tem capacidade de crescer e formar biofilmes na superfície de tomate e este fato pode dificultar a ação do sanitizante, pois o biofilme torna-se uma barreira física ao agente químico utilizado.

O mecanismo de adesão microbiana ainda não foi totalmente elucidado, mas sugere-se que interações hidrofóbicas entre a camada da epiderme e os micro-organismos facilitam a adesão em cutículas rompidas, estômatos, lenticelas e tricomas (BURNETT e BEUCHAT, 2001; SEYMOUR *et al.*, 2002; SOLOM e MATTHEWS, 2006; VELÁZQUEZ *et al.*, 2009). Embora as cutículas de plantas contenham ceras que dificultam a adesão dos micro-organismos ao tecido vegetal e protegem de estresses ambientais, alguns patógenos em vegetais e em humanos podem romper essa barreira (ARUSCAVAGE *et al.*, 2006). A capacidade de patógenos aderirem fortemente à epiderme de folhas pode reduzir a eficiência dos tratamentos de descontaminação e a inativação microbiana completa não é possível (ANNOUS *et al.*, 2005; ALLENDE *et al.*, 2008). Pode ocorrer ainda a infiltração de patógenos no tecido de frutas e hortaliças durante o contato da superfície do produto com células presentes na água ou no solo (BURNETT *et al.*, 2000; FRANZ *et al.*, 2007).

As imagens A, B e C, feitas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 3), confirmaram o efeito do ultrassom, ácido láctico e ultrassom combinado ao ácido láctico na remoção de células aderidas à superfície, sugerindo estes tratamentos uma alternativa na descontaminação de hortaliças. Os tratamentos de sanitização durante 5 min mostraram-se tão eficientes na remoção de *S. Enteritidis* aderidas a superfície de tomate cereja quanto ao obtido por São José (2009) que tratou esta mesma hortaliça intencionalmente contaminada com *S. Typhimurium* com ultrassom combinado associado ao ácido peracético por 10 min e o tratamento apenas com ultrassom por 30 min.

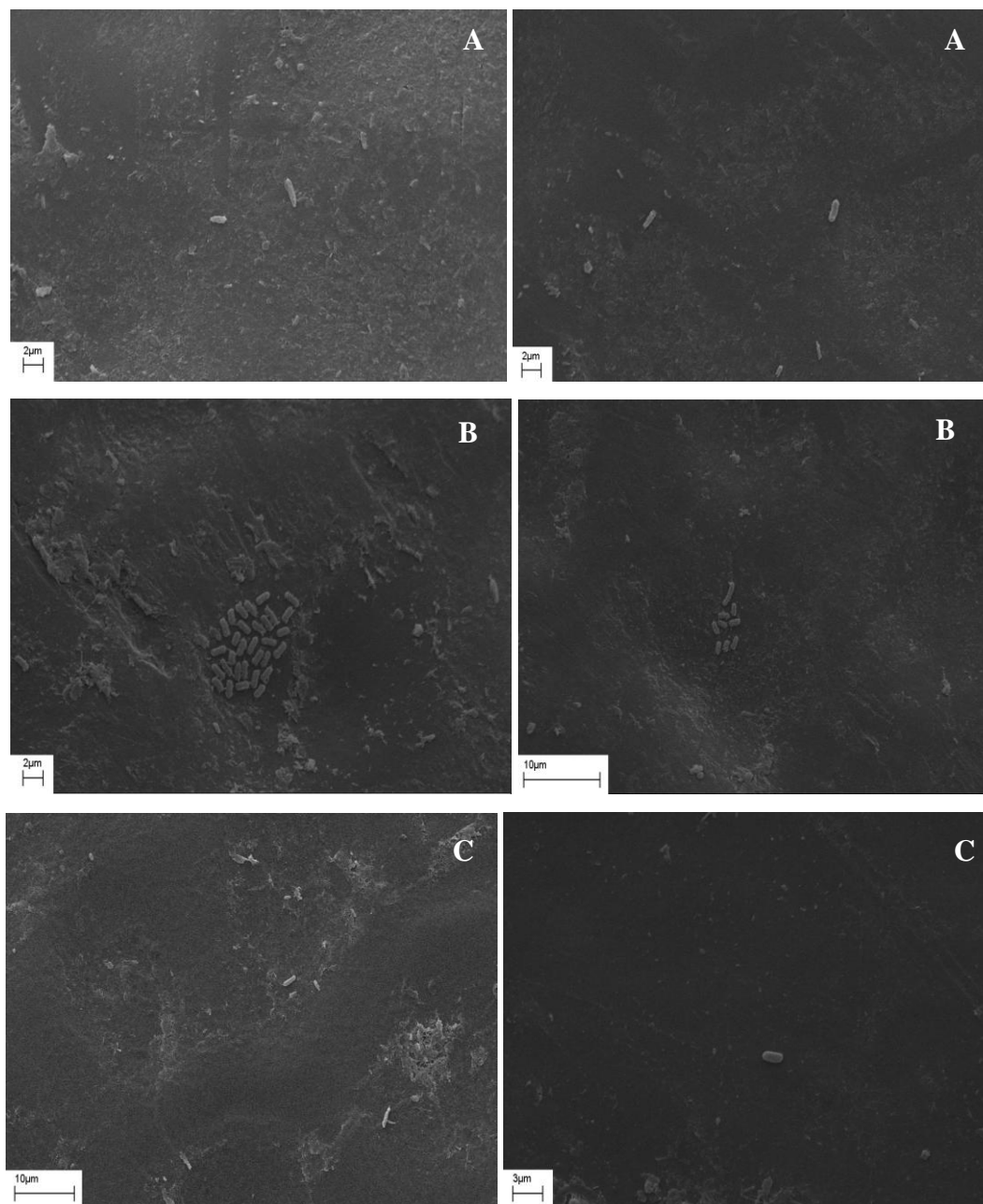


Figura 3 - Fotomicrografias de células de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 aderidas à superfície de tomate cereja observadas por microscopia eletrônica de varredura após tratamento com: ultrassom 40 kHz por 5 min (A), ácido láctico 1% por 5 min (B), ultrassom 40 kHz associado ao ácido láctico 1% por 5 min (C).

Estes resultados contribuem para a confirmação de que a associação do ultrassom a agentes químicos pode promover maior inativação de micro-organismos. Huang *et al.* (2006) observaram que a eficiência do ultrassom 170 kHz na remoção de bactérias aderidas a maçãs foi maior para *Salmonella* do que em *E. coli* O157:H7.

Esses autores verificaram que a combinação de tratamentos químicos e ultrassom promoveu maior redução na população contaminante de hortaliças e frutas. Gogate e Kabadi (2009) também concluíram que, quando o ultrassom é empregado associado com agentes químicos pode aumentar a eficiência de sanitizantes. São José e Vanetti (2012) aplicaram ácido peracético associado ao ultrassom durante 10 min e verificaram redução de  $3,88 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  de células de *S. Typhimurium* aderidas a superfície de tomate cereja.

Na Figura 4 estão apresentadas as fotomicrografias da superfície de tomate cereja após tratamentos de sanitização com detergente a base de tensoativos, ultrassom combinado a detergente a base de tensoativos, nanopartículas de prata e ultrassom combinado a nanopartículas de prata. É possível observar a presença de *S. Enteritidis* nas irregularidades da superfície do tomate cereja, o que confirma a hipótese de que adesão pode ser favorecida pela rugosidade da superfície do vegetal. Nas imagens das superfícies tratadas apenas com o detergente, observa-se a presença de células o que indica que este tratamento não favoreceu a remoção das células aderidas. Entretanto, a combinação deste agente químico com ultrassom permitiu maior remoção das células. Provavelmente, a remoção das células aderidas foi decorrente da ação do ultrassom.

Ao observar as imagens C e D na Figura 4 verifica-se a presença de maior número de células na superfície sanitizada com ultrassom combinado a nanopartículas de prata  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  o que confirma o resultados observados na contagem em placa. A associação das nanopartículas de prata ao tratamento com ultrassom pode ter provocado alterações estruturais nas nanopartículas e que culminaram em menor efeito antimicrobiano.

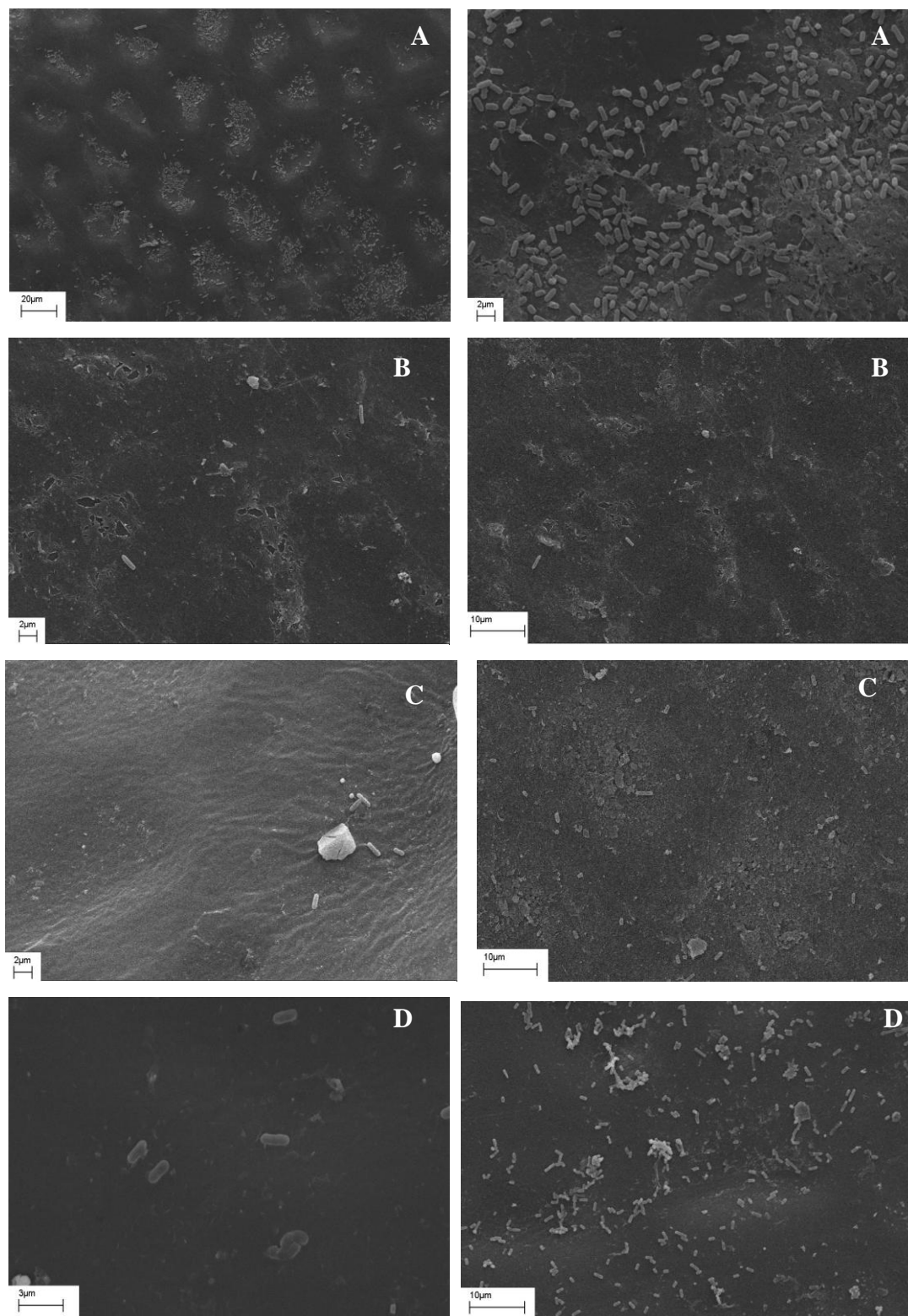


Figura 4 - Fotomicrografias de células de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 aderidas à superfície de tomate cereja observadas por microscopia eletrônica de varredura após tratamento com: detergente a base de tensoativos por 5 min (A), ultrassom 40 kHz combinado ao detergente a base de tensoativos por 5 min (B), nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  por 5 min (C) e ultrassom 40 kHz combinado a nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  por 5 min (D).

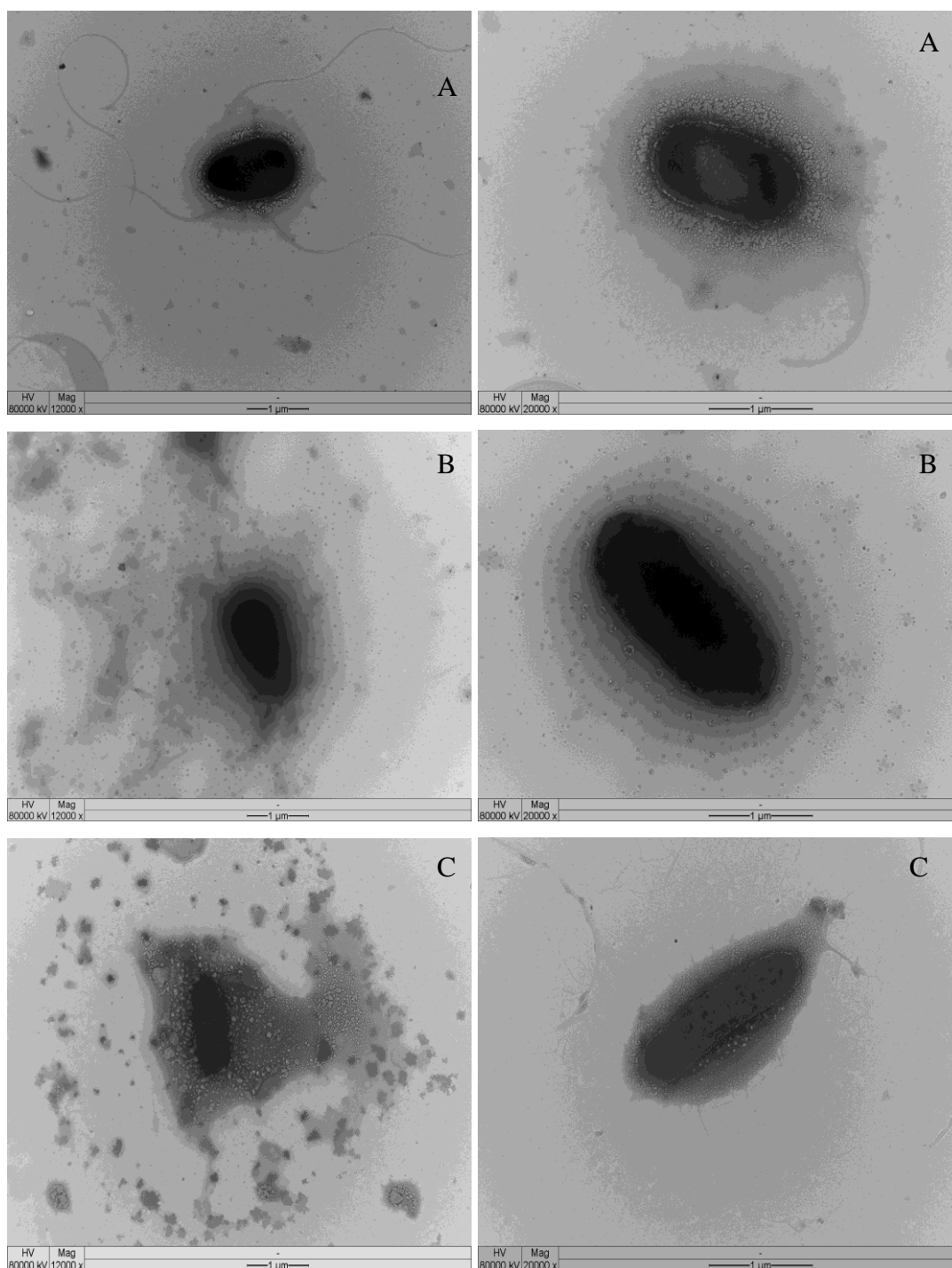
### 3.4.3. Avaliação das alterações na estrutura celular de *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076 por Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens feitas por microscopia eletrônica de transmissão das células de *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076 mostraram mudanças em sua aparência externa após sanitização por ultrassom 40 kHz associado ao ácido láctico 1 % e tratadas com nanopartículas de prata  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figura 5).

Pode se observar que células não tratadas apresentaram cápsula e flagelos íntegros, enquanto células tratadas com ultrassom associado ao ácido láctico e tratadas com nanopartículas de prata apresentaram perda parcial ou total dessas estruturas. O gênero *Salmonella* apresenta diversos fatores de virulência como a presença de cápsula e fímbrias responsáveis pela fixação, flagelos que permitem a translocação, produção de enzimas e outros fatores que permitem a invasão celular e a produção de toxinas (OHL e MILLER, 2001). A presença de cápsula em células de *Salmonella* pode estar associada com o aumento da infectividade e virulência (BHAN et al., 2005). Várias bactérias são capazes de se proteger de condições ambientais, resposta imune do hospedeiro e da fagocitose pela secreção de matriz de polissacarídica e estes são geralmente classificados em três categorias: os polissacarídeos extracelulares, que são apenas fracamente associados com a bactéria, polissacarídeos capsulares, os quais estão mais fortemente ligados à superfície da bactéria, e lipopolissacarídeos, que formam a base do folheto exterior da membrana externa de bactérias gram-negativas e estão sempre ancorados à superfície celular através de lípido A (SNYDER et al., 2006). Dessa forma, a desestruturação dessas estruturas pela ação de agentes de sanitização, como ultrassom, contribui para diminuição da virulência da bactéria. A danificação desses apêndices celulares pode dificultar a permanência dessas células em superfícies.

Apesar das bactérias gram-negativas apresentarem a membrana externa como uma barreira a mais para proteção celular foi possível observar uma desestabilização da membrana externa na célula de *S. enterica* Enteritidis. As alterações provocadas na estrutura da célula bacteriana como o rompimento da membrana externa e inicialização da formação de poros, podem favorecer a perda na permeabilidade da membrana celular. Feliciano et al. (2012) relataram que quando a membrana externa de bactéria gram-negativa está danificada, a célula perde a capacidade de controlar a permeabilidade. Este fato permite que compostos químicos externos penetrem

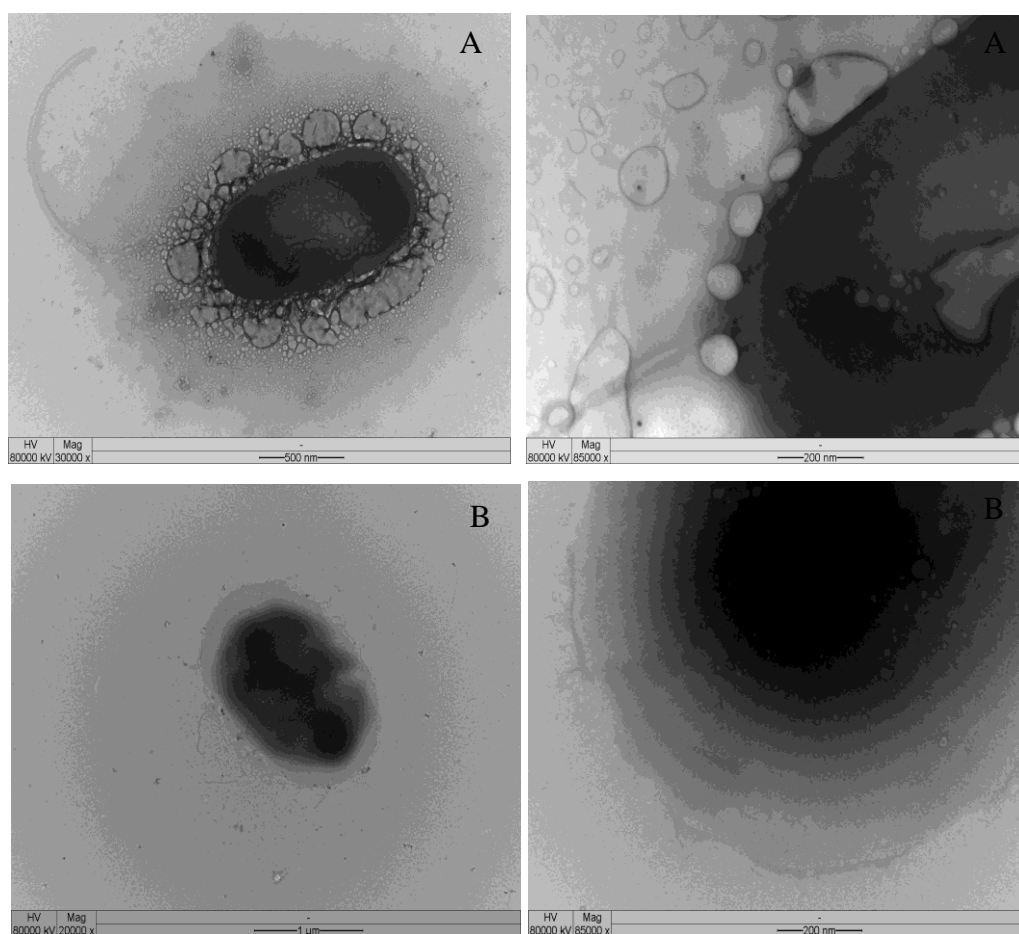
facilmente na parede celular e entram em contato com a membrana citoplasmática. Conseqüentemente, resulta em extravasamento do conteúdo celular (LIU *et al.*, 2004; TONG *et al.*, 2005).



**Figura 5** - Fotomicrografias de células de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076: A –sem tratamento, B- tratadas com ultrassom 40 kHz combinado ao ácido láctico 1% por 5 min, C – tratadas com nanopátículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup>, observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

A membrana externa de bactérias gram-negativas pode atuar como uma barreira e proteger a célula. No entanto, nas condições aplicadas por Ananta *et al.* (2005), foi observado que o ultrassom pode desestabilizar a membrana externa e facilitar a penetração de compostos. Desta forma, é interessante associar ultrassom com soluções químicas para facilitar a inativação de micro-organismos.

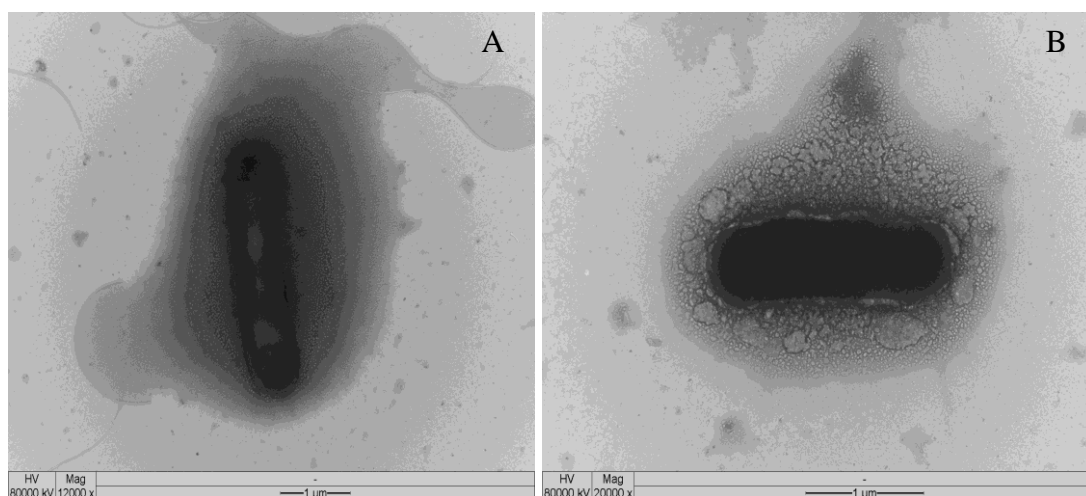
Na Figura 6 é possível observar células de *S. Enteritidis* submetidas à ação do ultrassom. As células apresentam menor quantidade de cápsula e ausência de flagelos. Muitas pesquisas têm sido feitas para investigar como ocorre o mecanismo de ruptura provocada pelo ultrassom, mas sabe-se que a cavitação é o principal fator envolvido. Os mecanismos envolvidos no rompimento celular são multifatoriais e podem incluir forças de cisalhamento geradas durante o movimento de bolhas ou súbitas mudanças de temperatura e pressão causadas pelo colapso da bolha (SALLEH-MACK e ROBERTS, 2007; ULUSOY *et al.*, 2007).



**Figura 6** - Fotomicrografias de células de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076: A- sem tratamento; B- tratadas com ultrassom 40 kHz por 5 min.

A inativação microbiana pelo ultrassom pode estar relacionada a danos na parede celular e estruturas da parede celular, que é suportado pelo fato de que algumas bactérias de determinadas espécies são mais resistentes à cavitação do que outras, sob mesmas condições de tratamento (ULUSOY *et al.*, 2007). Além disso, o afinamento das membranas das células em associação ao aquecimento e produção de radicais livres é essencial para a inativação. O efeito mecânico das ondas ultrassônicas e aumento da concentração de peróxido de hidrogênio pode causar forte oxidação das membranas lipídicas, com alteração da atividade enzimática de complexos proteicos responsáveis pela produção de ATP e a manutenção da concentração do soluto no interior da célula bem como afetar o material genético (Stanley *et al.*, 2004). Cameron *et al.* (2008) avaliaram o efeito de ultrassom 20 kHz sobre a sobrevivência de micro-organismos no leite UHT e observaram danos à parede celular externa e as membranas celulares internas.

Na Figura 7, podem ser observadas as fotomicrografias de célula não tratadas e tratadas com ácido lático 1 % por 5 min. Verifica-se perda do flagelo e parte da cápsula que envolve a célula bacteriana.

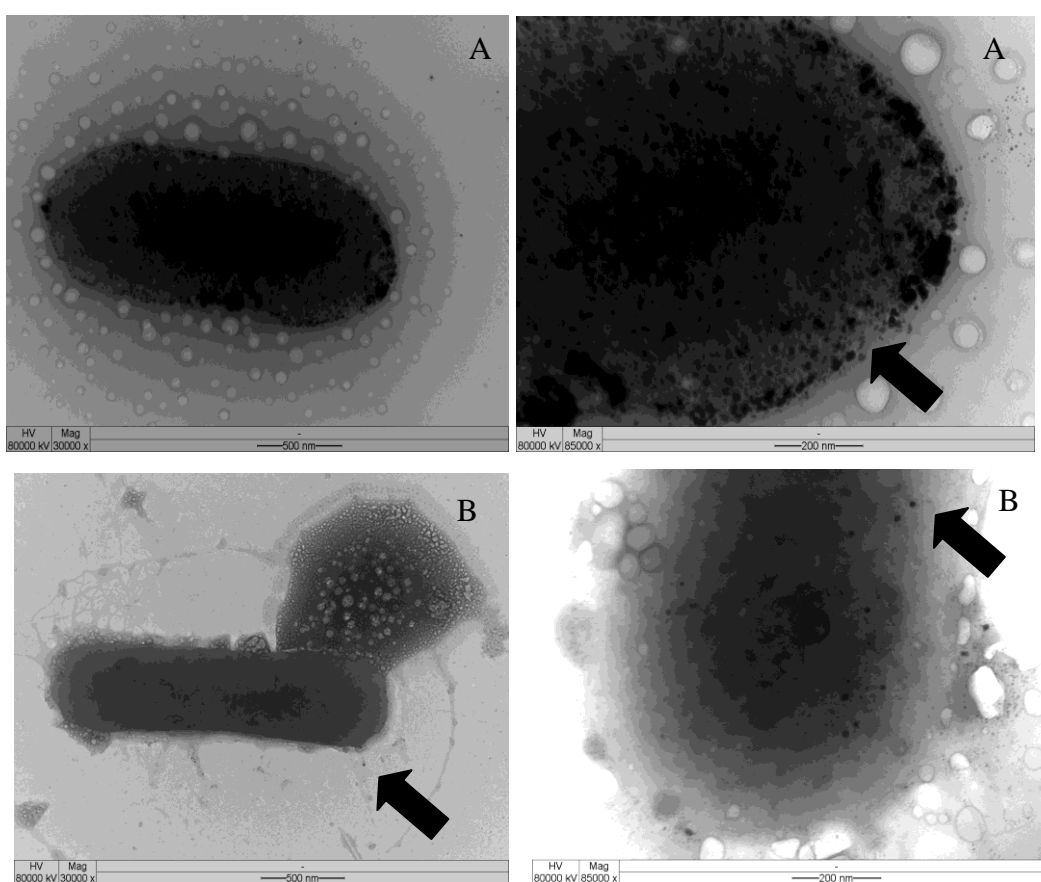


**Figura 7** - Fotomicrografias de células de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076: A- sem tratamento; B- tratadas com ácido lático 1% por 5 min.

Feliciano *et al.* (2012) observaram em células de *E. coli* após sanitização com ácido orgânico alterações visíveis caracterizadas pela aparência de separação do citoplasma e mencionaram que o ácido orgânico utilizado foi capaz de sequestrar íons como  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e formando complexos estáveis. Ao quelar íons da

membrana externa da bactéria gram-negativa há desestabilização e alteração da permeabilidade celular.

Pode ser observado na Figura 8, que as células tratadas com ultrassom associado ao ácido lático apresentaram pequenas bolhas ao redor da célula bacteriana que indica, possivelmente, o rompimento da cápsula e início de ruptura da membrana indicado pela seta. As células tratadas com nanopartículas de prata apresentam desestruturação da cápsula e podem ser observados pontos redondos de coloração preta que sugerem a presença de nanopartículas (indicado pela seta) ao redor da célula e na superfície celular.



**Figura 8** - Fotomicrografias de células de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 tratadas com A - ultrassom 40 kHz combinado ao ácido lático; B- com nanopartículas de prata; por 5 min, observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

O efeito de nanopartículas de prata em células microbianas pode ser diferenciado de acordo com o tamanho das partículas. Aquelas pequenas são mais ativas que as partículas maiores (PAL *et al.*, 2007). Dror-Ehre *et al.* (2009) sugeriram que o efeito da inativação de bactérias por nanopartículas está associada a colisão e eficiências de fixação entre duas partículas de diferentes tamanhos que estão no intervalo de tamanho nanométrico e biocolóides (células bacterianas), que estão no intervalo de tamanho micrométrico.

#### 3.4.4. Avaliação da presença de resíduos de prata na superfície de tomate cereja após a sanitização por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X

Na Figura 9 está apresentado o espectro da superfície de tomate cereja após a sanitização com nanopartículas de prata.

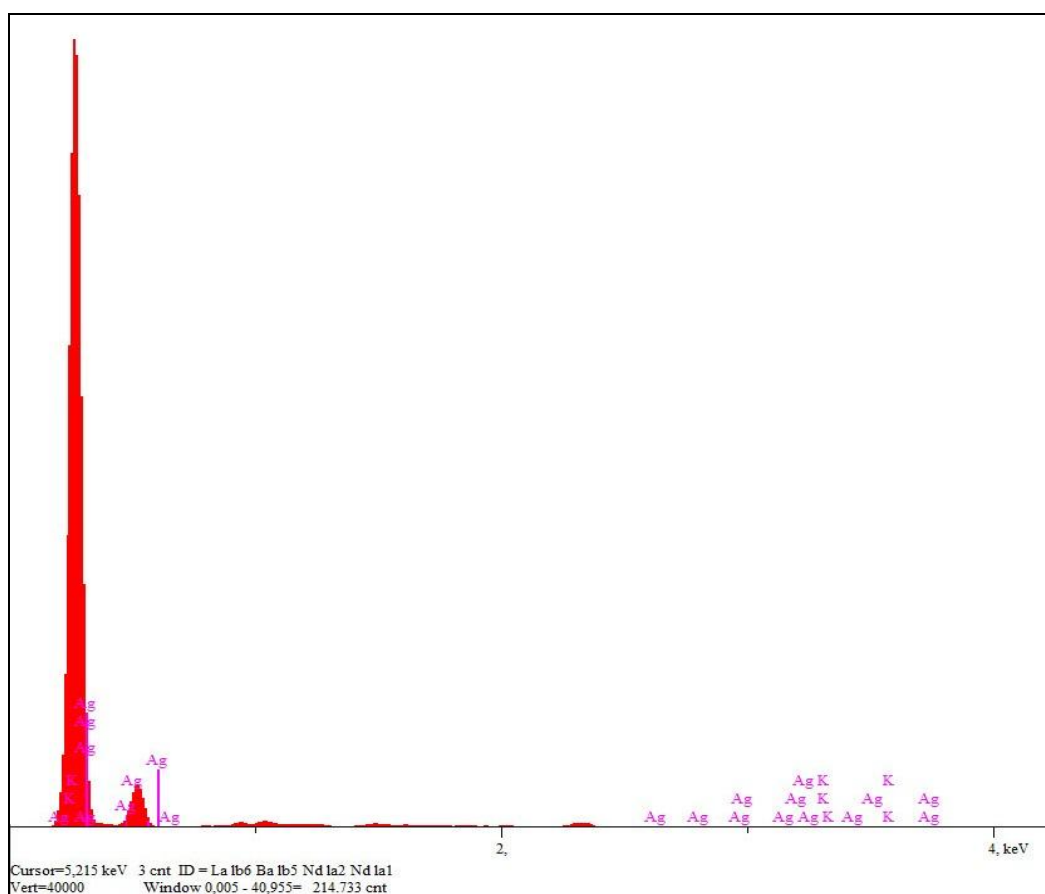


Figura 9 – Espectro de superfície de tomate cereja tratada com nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup>.

Na superfície de tomate cereja tratada com nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  observou-se presença de prata com percentual, entre os componentes analisados, que variou de 4,73 – 5,04 %. O aumento das aplicações de nanopartículas ocasionou a preocupação com os riscos a saúde e ao meio ambiente devido à exposição e o uso destas (PALAVICINI *et al.*, 2010). Dessa forma, qualquer aplicação e, ou tratamento que utilize nanopartículas de prata, por exemplo, devem ser avaliados com intuito de verificar e quantificar a presença de resíduos.

Não há relatos da aplicação de nanopartículas de prata em frutas e hortaliças. Entretanto, a aplicação de agentes químicos em nanoescala deve ser investigada e entendida para evitar risco aos seres humanos e ao ambiente (ZHANG *et al.*, 2012).

A presença de prata em alface sanitizadas com soluções cuja composição continha diferentes proporções de prata e peróxido de hidrogênio foi investigada por Gopal *et al.* (2010) e observaram que a maior absorção de íons de prata pela alface foi  $0,13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  quando se utilizou a proporção 0,05:0,04  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . No entanto, a lavagem das amostras com concentrações maiores de prata: peróxido de hidrogênio (5:0,4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mostrou menor absorção de prata (0,042  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de acordo com as determinações do metal pela espectroscopia de absorção atômica.

A presença de resíduos de prata foi avaliada por Zhang *et al.* (2012) por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão e constataram que as nanopartículas de prata penetraram através da película externa da pêra por meio de aberturas do tecido. Foi observado que as nanopartículas de prata estavam firmemente ligadas aos tecidos devido à elevada área superficial. O resultado de Zhang *et al.* (2012) indica que nanopartículas de prata podem internalizar no tecido vegetal por meio da interação com substâncias macromoleculares, tais como o polissacarídeos ou de pectina da polpa de frutas, e permancecem firmemente ligadas a superfície após 4 dias de tratamento, o que torna relevante a investigação da penetração no interior dos tecidos vegetais.

Na Figura 10 pode ser observado o mapeamento da presença de prata na superfície de tomate cereja. Os pontos verdes indicam a distribuição de prata na superfície e indicam que está presente tanto em regiões com bactérias aderidas quanto em regiões sem adesão. Na análise qualitativa da presença de potássio e prata, esses elementos ocorreram na proporção de 25,82% e 74,18% respectivamente. A superfície sem tratamento e sem bactérias aderidas apresentaram a proporção de 95,36 e 4,63% de potássio e prata na superfície. Vale destacar que essa análise é

qualitativa sendo o percentual indicado na análise proporcional a quantidade de elementos avaliados.

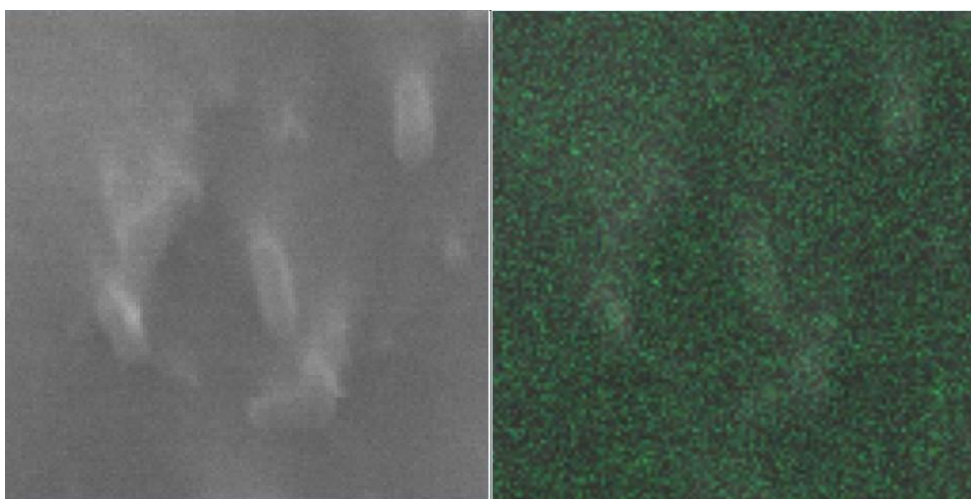


Figura 10 - Mapa da distribuição de prata em superfície de tomate cereja com *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076.

Como a proposição do presente trabalho é sanitizar tomate cereja e tornar este produto pronto para o consumo imediato, são necessários mais estudos para verificar a interação da prata com o tecido vegetal, sua internalização e permanência ao longo do armazenamento.

Além da avaliação da presença e quantidade de prata na superfície, é de extrema importância a verificação da quantidade de prata presente na solução que será descartada no ambiente. A quantidade de prata presente na água potável que não gera riscos para saúde é igual  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (WHO, 2011).

#### **3.4.5. Avaliação da alteração das nanopartículas de prata após uso do ultrassom por meio da medida do raio hidrodinâmico e por microscopia eletrônica de transmissão**

Constatou-se diferença dos diâmetros das nanopartículas associadas ou não ao tratamento com ultrassom (Tabela 10). Além disso, observou-se alteração da coloração das nanopartículas após tratamento associado ao ultrassom (Figura 11).

O ultrassom, por ser um agente físico na sanitização, pode interferir em características de agentes químicos quando se associam. Dessa forma, é importante

avaliar a alteração do tamanho das nanopartículas antes e após a utilização combinada ao ultrassom.

Tabela 10 – Diâmetro médio das nanopartículas de prata medidos por espalhamento dinâmico de luz.

Amostra	Diâmetro (nm)
Nanopartículas de prata $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$253,23a \pm 16,42$
Nanopartículas de prata $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + Ultrassom 40 kHz	$428,46b \pm 7,06$

\* Médias  $\pm$  Desvio Padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si ( $p>0,05$ ).

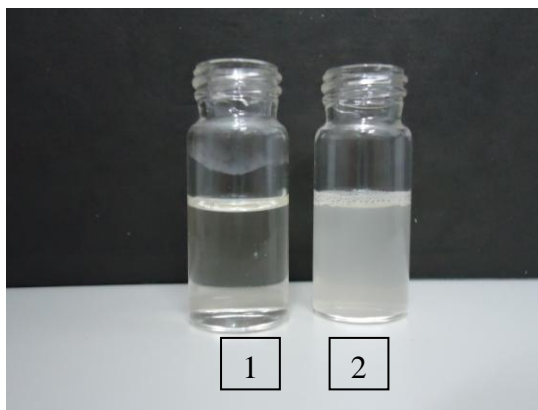


Figura 11 – Amostras de nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  não tratadas (1) e tratadas com ultrassom (2) por 5 min a  $7^\circ\text{C}$ .

A microscopia eletrônica de transmissão revelou que as nanopartículas de prata utilizadas no presente trabalho apresentaram forma arredondada e com diâmetros entre 20 a 100 nm. As nanopartículas utilizadas em associação ao ultrassom apresentaram diâmetros iguais ou superiores a 200 nm, sendo que sua forma original foi alterada (Figura 12). Foi observada ainda a aglomeração das nanopartículas de prata no tratamento em associação ao ultrassom. A ação do ultrassom pode ter contribuído para a remoção do agente surfactante presente na estrutura da nanopartícula de forma a facilitar a aproximação das partículas de prata. Essa agregação das partículas possivelmente culminou em aumento do diâmetro e conseqüentemente menor efeito antimicrobiano.

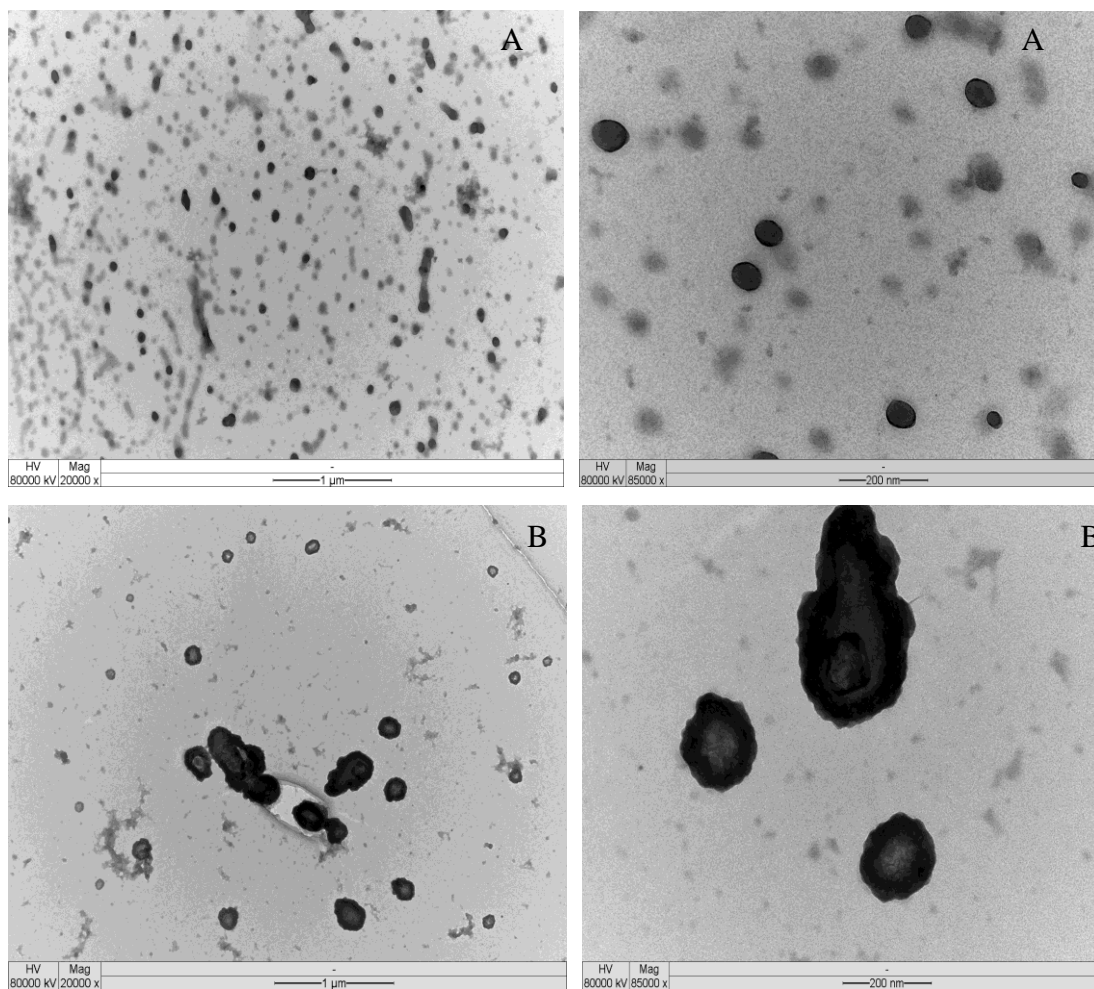


Figura 12 – Nanopartículas de prata observadas por microscopia eletrônica de transmissão: A- sem tratamento e, B- após tratamento associado ao ultrassom por 5 min.

#### 4. CONCLUSÕES

A superfície de tomate cereja apresentou rugosidade média igual a 2,66  $\mu\text{m}$  e este fator contribuiu para a adesão de *Salmonella enterica* Enteritidis, mesmo esta sendo considerada termodinamicamente desfavorável.

Os tratamentos com US+AL 1% e NP apresentaram os melhores resultados no teste desafio com *S. Enteritidis* e as análises das imagens das microscopias mostraram os efeitos dos tratamentos de sanitização na remoção de células e ação na estrutura celular de *S. Enteritidis*.

Os tratamentos US+ AL 1% e NP têm potencial para uso na sanitização de tomates cereja. Entretanto, a presença de prata detectada na superfície de tomate cereja serve de alerta para a necessidade de tratamento adicional que permita a remoção do excesso de prata na superfície ou de ajuste da concentração para impedir depósitos de prata na superfície de tomates cereja sanitizados por este tratamento.

## 5. REFERÊNCIAS

AKBAS, MY; ÖLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, n.66, p.619-624, 2007.

ALAKOMI, H.-L. ; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I.M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p.2001-2005, 2000.

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, n.3, p.2514-2518, 2008.

ANANTA, E.; VOIGT, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; AND KNORR, D. Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.3, p.271–278, 2005.

ANNOUS, B.A.; SOLOMON, E.B.; COOKE, P.H., BURKE, A.M., UKUKU, D.O. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melon. **Journal of Food Safety**, n.25, p. 276-287, 2005.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of Analysis**. Washington DC, 2005. 1904p

ARAÚJO, E.A.; ANDRADE, N.J.; CARVALHO, A. F.; RAMOS, A.M.; SILVA, C.A.S. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p.1940-1948, 2010.

ARASHIRO, E.Y. ; DEMARQUETTE, N.R. Use of the pendant drop method to measure interfacial tension between molten polymers. **Materials Research**, v.2, p. 23-32, 1999.

ARUSCAVAGE, D.; LEE, K.; MILLER, S.; LEJUNE, J.T. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. **Journal of Food Science**, v.7, n.8, p.89-99, 2006.

AYYILDIZ, O.; SANIK,S.; ILERI, B. Effect of ultrasonic pretreatment on chlorine dioxide disinfection efficiency. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n.2, p.683-688, 2011.

BHAN, M.K., BAHL, R., BHATNAGAR, S. Typhoid and paratyphoid fever. **Lancet**, v.366, n.9487, p. 749–762, 2005.

BOTERO, A.E.C.; TOREM, M.L.; MESQUITA, L.M.S. Perspectiva e potencial aplicação de biorreagentes na flotação de minerais. **Revista Escola de Minas**, v. 61, n.1, p.57-61, 2008.

BRANDL, M., AMUNDSON, R. Leaf age as a risk factor in the contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2298-2306, 2008.

BRASIL. Resolução RDC nº12. de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília. DF. 02 jan. 2001.

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.

BUSSCHER, H. J., A. H. WEERKAMP, H. C. VAN DER MEI, A. W. J. van Pelt, H. P. de Jong, and J. Arends. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p.980-983, 1984.

BUSSCHER, H. J.; SJOLLEMA, J. van DER MEI, H. Relative Importance of Surface Free Energy as a Measure of Hydrophobicity in Bacterial Adhesion to Surfaces. In : Doyle, R. J. and Rosenberg, M. (Eds). **Microbial cell surface hydrophobicity**. American Society of Microbiology, Washington, D. C, 1990.

CAMERON, M.; MCMASTER, L. D.; BRITZ, T. J. Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p.960–964, 2008.

CHAMAKURA, K.; PEREZ-BALLESTERO, R.; LUO, Z.; BASHIR, S.; LIU, J. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 84, n.1, p.88-96, 2011.

CHAVES, L. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contato com Água Potável**. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal, 2004.

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

CHOI, O.; DENG, K.K.; KIM, N.J.; ROSS, L. JR.; SURAMPALLI, R.Y.; HU, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. **Water Research**, v.42, n.1, p.3066- 3074, 2008.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001 . 676p.

DROR-EHRE, A.; MAMANE, H.; BELENKOVA, T.; MARKOVICH, G.; ADIN, A. Silver nanoparticle–*E. coli* colloidal interaction in water and effect on *E. coli* survival. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 339, p.521–526, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2008. **Guidance for Industry: Guide to minimize food safety hazards for fresh-cut fruits and vegetables**. Federal Register, v.72, p.11364–11368, 2008.

FELICIANO, L.; LEE, J.; PASCALL, M.A. Transmission electron microscopic analysis showing structural changes to bacterial cells treated with electrolyzed water and an acidic sanitizer. **Journal of Food Science**, v.77, n. 4, p. m182–m187, 2012.

FERNANDES, P. E. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação do seu efeito antimicrobiano**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

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.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. 2000. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FRANZ, E.; VISSER, A.A.; van-DIEPENINGEN, A.D.; KLERKS, M.M.; TERMOESHUIZWN, A.J.; van-BRUGGEN, A.H.C. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Food Microbiology**, v.24, n. 1, p. 106-112, 2007.

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

GONZALEZ, R.J.; LUO, Y.; RUÍZ-CRUZ, S.; MCEVOY, J.L. Efficacy of sanitizers to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut carrots shreds under simulated process water conditions. **Journal of Food Protection**, v.67, p. 2375–2380, 2004.

GOPAL, A.; COVENTRY, J.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; AJLOUNI, S. Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. **Food Microbiology**, v. 27, n.2, p.210-219, 2010.

HASSAN,A.N.; FRANK,J.F. Influence of surfactant hydrophobicity on the detachment of *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, n.1-2, 145-52, 2003.

HUANG, T.S.; XU, C.L.; WALKER, K.; WEST, P.; ZHANG, S.Q.; WEESE, J. Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. **Journal of Food Science**, v.71, n. 4, p. m134-m139, 2006.

HUANG, Y.; CHEN, H. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. **Food Control**, v.22, n.8, p.1178-1183, 2011.

IBRAHIM, S. A.; YANG, H.; SEO, C. W. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Chemistry**, v.109, p.137e143, 2008.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria–material interactions. **Europeana Cells & Materials Journal**, v.8, p.37–57, 2004.

KESKINEN, L. A.; ANNOUS, B. A. Efficacy of adding detergents to sanitizer solutions for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Romaine lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, n. 3, p.157–161, 2011.

LIMA, P.M., SÃO JOSÉ, J.F.B., ANDRADE, N.J., PIRES, A.C.S., FERREIRA, S.O. (2013). Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of *Salmonella* Enteritidis. **Food Control**, v.30, n. 1, p. 157–161, 2013.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; LIPING, S. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, n.1, p.147–55. 2004.

LUND, D. G.; PETRINI, L. A.; ALEIXO; J.A.G.; ROMBALDI, C. V. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1431-1435, 2005.

MAYNARD, A.D.; AITKEN, R.J.; BUTZ, T.; COLVIN, V.; DONALDSON, K.; OBERDORSTER, G.; PHILBERT, M.A.; RYAN, J.; SEATON, A.; STONE, V.; TINKLE, S.S.; TRAN, L.; WALKER, N.J.; WARHEIT, D.B. Safe handling of nanotechnology, **Nature**, v.444, n.16, p. 267–269, 2006.

NEAL, J.A.; MARQUEZ-GONZALEZ, M.; CABRERA-DIAZ, E.; LUCIA, L.M.; O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C.; CASTILLO A. Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. **Food Research International**, v.45, n.2, p.1123-1128, 2012.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Reviews Medicine**, v.52, p. 259-274, 2001.

OLIVEIRA, A M C.; COSTA, J. M. C. da; MAIA, G. A. Qualidade higiênico-sanitária de abacaxi 'pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira Promoção da Saúde**, v. 19, n. 1, p. 19-24, 2006.

PAL, S., TAK, Y.K., SONG, J.M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1712–1720, 2007.

PANÁČEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V. K.; NEVECNA, T.; ZBORIL, R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. **Journal Physic Chemistry B**, v.110, n.33, p. 16248–16253, 2006.

PALLAVICINI, P.; TAGLIETTI, A.; DACARRO, G.; DIAZ-FERNANDEZ, Y. A.; GALLI, M.; GRISOLI, P.; PATRINI, M.; DE MAGISTRIS, G. S.; ZANONI, R.. Self-assembled monolayers of silver nanoparticles firmly grafted on glass surfaces: Low Ag<sup>+</sup> release for an efficient antibacterial activity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, p.110–116, 2010.

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.; SUMNER, S. S.; EIFERT, J. D.; PIERSON, M. D. Efficacy of detergents in removing *Salmonella* and *Shigella* spp. from the surface of fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.66, p.2210–2215, 2003.

RASO, J.; PAGÁN, R.;CONDÓN, S.; SALA, F.J. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. **Applied and Environmental Microbiology**, 64, p.465–471. 1998.

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.

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

SALLEH-MACK, S.Z.; ROBERTS, J.S.; Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.14, n.3, p.323-329, 2007.

SAMBHY, V.; MACBRIDE, M. M.; PETERSON, B. R.; SEN, A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: Dual action tunable antimicrobial materials. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128 p. 9798-808, 2006.

SÃO JOSÉ. J.F.B. **Sanitização por Ultrassom e Agentes Químicos no Processamento Mínimo de Hortaliças**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. 2009

SÃO JOSÉ, J.F.B., & VANETTI, M.C.D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers on natural microbiota and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v.24, n.1-2, p.95-99, 2012.

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.

SENGÜL, M., ERKAYA, T., BASLAR, M., & ERTUGAY, F. Effect of photosonication treatment on inactivation of total and coliform bacteria in milk. **Food Control**, v.22, n.11, p.1803e1806, 2011.

SCOUTEN, A. J.; BEUCHAT, L. R. Combined effects of chemical and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.4, p.668-674, 2002.

SNYDER, D.S.; GIBSON, D.; HEISS, C.; KAY, W.; AZADI, P. Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella* Enteritidis. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 14, p. 2388–2397, 2006.

SOLOMON, E.B.; MATTHEWS, K.R. Interaction of live and dead *Escherichia coli* O157:H7 and fluorescent microspheres with lettuce tissue suggests bacterial processes do not mediate adherence, **Letters in Applied Microbiology**, v.42, n.2, p. 88–93, 2006.

STANLEY, K. D., GOLDEN, D. A., WILLIAMS, R. C., WEISS, J. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by high-intensity ultrasonication in the presence of salts. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.1, n.1, p.267–273, 2004.

STREVETT, K.A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Res. Microbiology**, v.154, p.329-335, 2003.

TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.A. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Control**, v.22, n.2, p.801-804, 2011.

TOMÁS-CALLEJAS, A.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; SBODIO, A.; ARTÉS, F.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; SUSLOW, T.V. Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* cross-

contamination on fresh-cut Red Chard. **Food Control**, v.23, n.2, p.325-332, 2012.

TONG, G.; YULONG, M.; PENG, G; ZIRONG, X. Antibacterial effects of the Cu(II) exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. **Veterinary Microbiology**, n.105, p.113–22, 2005.

TIWARI, D.K.; BEHARI, J. Biocidal nature of combined treatment of Ag-nanoparticle and ultrasonic irradiation in *Escherichia coli* DH5. **Advances in Biological Research**, v.3, n.3-4, p.89-95, 2009.

VIRTO, R.; SANZ, D.; ÁLVAREZ, I.; CONDÓN; RASO, J. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, n.3, p.251– 257, 2005

WANG, H; FENG, H.; LIANG, W.; LUO Y.; MALYARCHUK, V. Effect of Surface Roughness on Retention and Removal of *Escherichia coli* O157:H7 on Surfaces of Selected Fruits. **Journal of Food Science**, v. 74, n.1, p.e8-e15, 2009.

WHITEHEAD, K.A.; COLLIGON, J.S.; VERRAN, J. The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.54, n.2-3, p.143- 151, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking water quality. **Silver**. 4<sup>th</sup> ed. (2011).Access on: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf)>.

VAN DER MEI, BOS, R.; BUSSCHER, H. J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity base don contact angles. **Colloids and Surfaces**, v.11, p. 213-221, 1998.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hidrophilicity and hidrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity and Hydrophilicity of Biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.2, 503-512, 1997.

VELÁZQUEZ, L.D.C.; BARBINI, N.B.; ESCUDERO, M.E.; ESTRADA, C.L. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. **Food Control**, v.20, p.262-269, 2009.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.74, n.1, p.69-117,1998.

ULUSOY, B.H.; COLAK, H.; HAMPIKYAN, H. The use of ultrasonic waves in Food Technology. **Research Journal of Biological Sciences**, v.2, n.4, p.491-497, 2007.

ZHANG, Z.; KONG, F.; VARDHANABHUTI, B.; MUSTAPHA, A., LIN M. Detection of engineered silver nanoparticle contamination in pears. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.60, n. 43, p. 10762-10767, 2012.

ZHOU, B.; FENG, H.; LUO, Y. Ultrasound enhanced sanitizer efficacy in reduction of *Escherichia coli* O157: H7 population on spinach leaves. **Journal of Food Science**, v.74, n.6, m308–m313, 2009.

## CAPÍTULO 3

### **Sanitização de tomate cereja por ultrassom, detergente a base de tensoativos, ácido láctico e nanopartículas de prata: efeitos na microbiota natural contaminante e nas características físico-químicas**

#### **RESUMO**

A etapa de lavagem associada ao uso de soluções sanitizantes é considerada a única etapa do processamento mínimo de frutas e hortaliças que reduz o número de micro-organismos deterioradores e patogênicos, contribuindo assim, para a segurança do produto. Neste estudo, ácido láctico, detergente a base de tensoativos, nanopartículas de prata, ultrassom e os agentes químicos associados ao ultrassom foram avaliados quanto ao efeito nas características microbiológicas e físico-químicas de tomates cerejas armazenados a 7 °C. As análises microbiológicas consistiram de avaliação de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, coliformes a 35 °C, bactérias lácticas e psicotróficos aeróbios. Foram realizadas análises físico-químicas: acidez titulável, pH, teor de sólidos solúveis, cor instrumental, firmeza, teor de licopeno, betacaroteno e ácido ascórbico. Logo após a sanitização, a contagem de mesófilos aeróbios reduziu de 0,27 a 2,33 log UFC·g<sup>-1</sup> de acordo com o tratamento aplicado. As contagens de fungos filamentosos e leveduras logo após a sanitização e ao final do período de armazenamento foram iguais a 4,70 e 6,13 log UFC·g<sup>-1</sup>, respectivamente. Dentre os tratamentos propostos, destacaram-se o uso de ácido láctico 1 %, nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup> e ultrassom associado a estes dois sanitizantes que reduziram em média 2 log UFC·g<sup>-1</sup> a população de coliformes a 35 °C. Os tratamentos de sanitização reduziram de 0,41 a 2,64 log UFC·g<sup>-1</sup> o número de bactérias lácticas. A contagem média de psicotróficos aeróbios logo após a sanitização foi 3,90 a 6,29 log UFC·g<sup>-1</sup> e ao final do armazenamento, os tomates cerejas sanitizados alcançaram contagens entre 5,07 e 7,70 log UFC·g<sup>-1</sup>. De forma geral, os tratamentos com ácido láctico 1 %, nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup> e estes tratamentos em associação ao ultrassom apresentaram maiores reduções dos micro-organismos avaliados. Não houve alteração dos valores de acidez titulável, pH, sólidos solúveis, cor instrumental, firmeza da polpa, conteúdo de licopeno e

betacaroteno após os tratamentos de sanitização e ao longo do período de 10 dias a 7 °C. Observou-se que os tomates cereja tratados com ultrassom apresentaram menores valores de firmeza, e o conteúdo de ácido ascórbico modificou nos tomates submetidos a diferentes tratamentos aplicados e ao longo do armazenamento e aumentou com o tratamento com dicloroisocianurato de sódio, detergente a base de tensoativos, ácido láctico, ultrassom associado ao detergente e ultrassom associado a nanopartículas de prata. Estes resultados indicam que os tratamentos de sanitização avaliados têm potencial para aplicação em tomates cereja, sendo que o tratamento com ultrassom e ácido láctico apresentou maior efeito na redução da contaminação microbiológica e não afetou as demais características de qualidade da hortaliça.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das variedades de tomate com grande popularidade em todo o mundo é o tomate do tipo cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). O cultivo de tomate cereja ganhou impulso devido ao interesse da gastronomia moderna, pois apresenta como diferencial, o fato de ser saboroso e adocicado, a ponto de ser consumido como fruta ou como aperitivo. O tamanho reduzido e grande versatilidade fizeram o tomate cereja ganhar espaço em diferentes preparações gastronômicas. A utilização do tomate tipo cereja como adorno, aperitivo e na confecção de pratos diversos é uma opção a mais de consumo dessa hortaliça.

A demanda por tomate foi reforçada pela busca de alimentos mais saudáveis pelos consumidores, favorecendo também o crescimento da venda do produto fresco. O tomate é um alimento com propriedades funcionais em razão dos altos teores de vitaminas A e C, e é fonte de licopeno. Além de possuir propriedades antioxidantes, o tomate do tipo cereja destaca-se dos demais tipos de tomates pelo seu alto valor comercial e ampla aceitação pelo consumidor.

Os frutos do tomateiro são altamente perecíveis e de película bastante fina, tornando-se uma matéria-prima frágil para a colheita e movimentação logística. Os frutos possuem em sua composição, aproximadamente, de 93 a 95 % de água. Por ser amplamente consumido *in natura* e susceptível à contaminação por produtos tóxicos e micro-organismos, pode ocasionar prejuízos à saúde pública.

A qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas está diretamente relacionada à presença de micro-organismos deterioradores, que provocam alterações nas características sensoriais do produto e também, a micro-organismos patogênicos que, em determinada população, podem causar danos à saúde do consumidor. Frutas e hortaliças, muitas vezes possuem, naturalmente, elevada quantidade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Micro-organismos contaminantes são provenientes de diversas fontes, como água de irrigação, esterco, cultivo, colheita, manipulação pós-colheita, processamento e distribuição.

A operação de lavagem associada ao uso de soluções sanitizantes é considerada a única etapa do processamento que reduz o número de micro-organismos deterioradores e patogênicos, contribuindo assim, para a segurança do produto. Dentre os sanitizantes empregados na indústria de alimentos, principalmente em produtos frescos, os mais usados aqueles a base de cloro e compostos clorados. A

facilidade do uso, o baixo custo, a alta atividade antimicrobiana e completa dissolução em água, fazem com que os agentes clorados sejam frequentemente utilizados como sanitizantes na indústria de frutas e hortaliças.

Novos tratamentos de sanitização têm sido avaliados, pois a escolha do sanitizante é importante para adequação aos requisitos higiênicos e sanitários sem prejudicar as características sensoriais e nutritivas das frutas e hortaliças.

Ácidos orgânicos são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) e possuem capacidade de inativar patógenos envolvidos em contaminação de alimentos. O ácido láctico é um ácido orgânico e pode ser aplicado em hortaliças frescas. O ultrassom é uma tecnologia recomendada na indústria de alimentos com diferentes aplicações, dentre elas, a remoção de partículas aderidas à superfícies e a inativação de micro-organismos. A inativação é consequência de um processo denominado cavitação, que consiste de formação, crescimento e colapso de bolhas, que geram energia mecânica e química localizada. Quando o ultrassom é empregado associado com agentes químicos, o intenso gradiente de pressão permite a penetração desses agentes pela membrana celular dos micro-organismos.

Outros agentes químicos que podem ser empregados na sanitização são os detergentes/surfactantes. Há indícios que a adição destes na solução de sanitização ou água de lavagem reduz a tensão superficial da solução de sanitização e, portanto, melhora o contato com as células bacterianas e provoca maior inativação/remoção de bactérias da superfície de hortaliças. A combinação de detergentes com agentes sanitizantes físicos pode ter sua ação potencializada.

A prata tem sido avaliada como agente terapêutico e em processos de desinfecção de água. Além disso, o interesse do uso da prata tem aumentado principalmente com intuito de substituir os compostos clorados.

Sabe-se que frutas e hortaliças passam por várias alterações após a colheita, devido ao ambiente, adubação e lesão pelo processo de colheita. Os tratamentos de sanitização devem eliminar micro-organismos deterioradores e patogênicos de forma a oferecer aos consumidores um produto seguro e com vida de prateleira maior.

O crescente interesse dos consumidores em alimentos que buscam além da função básica, relacionada ao fornecimento de energia e nutrientes, é adquirir um produto que possua propriedades de promoção da saúde e prevenção de doenças. A qualidade desses produtos alimentares esta fortemente relacionada com o seu

processamento, manipulação e armazenamento. Alguns estudos têm demonstrado que essas operações têm efeitos importantes sobre o teor de compostos bioativos.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo de avaliar o efeito de diferentes tratamentos de sanitização na microbiota natural contaminante, características físico-químicas e teor de ácido ascórbico, licopeno e  $\beta$ -caroteno de tomates cerejas armazenados a 7 °C.

## **2.MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. Algumas análises foram feitas em outros laboratórios da mesma instituição: Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças e Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

### **2.1. Análises Microbiológicas**

#### **2.1.1. Amostras de tomate cereja**

As amostras de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) foram adquiridas em comércio varejista local, sendo acordado com o fornecedor que os tomates fossem procedentes do mesmo produtor para evitar variações. Em seguida, foram transportadas e armazenadas, sob refrigeração, a  $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por no máximo, 24 h, até o processamento mínimo e início das análises.

A seleção foi feita, descartando-se aqueles com má formação, danificados e, ou apodrecidos. Em seguida, foram lavados com água corrente para remoção das sujidades aderidas à superfície e drenados por 30 min em capela de fluxo laminar.

#### **2.1.2. Sanitização dos tomates cereja**

A etapa de sanitização consistiu na imersão de tomate cereja em solução sanitizante, por 5 min à temperatura de  $7 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foram avaliados os efeitos dos agentes sanitizantes: dicloroisocianurato de sódio  $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (DCS), ácido láctico 1 % (AL), solução de nanopartículas de prata  $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (NP), detergente a base de tensoativos (DET) associados ou não ao ultrassom (US) de baixa frequência de 40 KHz (*Ultrasonic Cleaner* Branson® 1510, EUA). Os controles foram o tratamento no qual os tomates cereja não foram submetidos à sanitização.

O dicloroisocianurato de sódio (DCS) Nippo Clor (Nippon<sup>®</sup>) e o detergente a base de tensoativos Nitrol WV 2640 (Nippon<sup>®</sup>) foram preparados segundo recomendações do fabricante. O ácido láctico (VETEC<sup>®</sup>) 85 % pureza foi diluído na concentração de 1% (v/v).

A síntese de nanopartículas foi realizada de acordo com metodologia desenvolvida por Fernandes (2010). Foram preparadas dispersões de brometo de dodeciltrimetil amônia (DOTAB) (Aldrich<sup>®</sup>)  $3,12 \times 10^{-2}$  M, o que corresponde a duas vezes a concentração micelar crítica (CMC). Em seguida, foi preparada a dispersão nas proporções de 1 g de sulfadiazina de prata (Dermazine<sup>®</sup>) para cada 100 mL de DOTAB na concentração mencionada. As dispersões obtidas foram mantidas sob agitação constante por 3 h a 25 °C. Percorrido o tempo de agitação, as amostras foram centrifugadas (*Eppendorf* 5804 R) a 4000 g por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e reservado para utilização.

Para cada tratamento, foram sanitizados 2 kg de tomates cereja sendo distribuídos em embalagens de polietileno tereftalato previamente submetidas a exposição em luz ultravioleta (254 nm) por 30 min em câmara de fluxo laminar. Os tomates cereja foram distribuídos em quantidades de 250 g em cada embalagem, em condições assépticas, e armazenados a 7 °C por 10 dias (Figura 1) e avaliados nos dias 0 e 10 quanto à sua qualidade microbiológica e nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 quanto à sua qualidade físico-química e nutricional.



Figura 1 – Tomates cereja antes da seleção e após o processamento distribuído em embalagens de polietileno tereftalato contendo 250 g de tomates cereja armazenados a 7 °C.

## **2.2. Avaliação da microbiota natural de tomate cereja após a sanitização e ao final do período de armazenamento**

Amostras de 25 g foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1%. A homogeneização foi feita em *stomacher* (Seward Medical Co., Londres, Reino Unido), por 2 min, em velocidade normal. Diluições decimais apropriadas foram preparadas e alíquotas dessas diluições foram transferidas para meios de cultura específicos para a determinação de cada grupo microbiano. O plaqueamento das alíquotas foi realizado em duplicata e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por grama (UFC·g<sup>-1</sup>).

### **2.2.1. Contagem de mesófilos aeróbios**

A determinação de mesófilos aeróbios foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade utilizando 1 mL das diluições previamente preparadas e em seguida, foi adicionado Ágar Padrão para Contagem (PCA, Himedia®), sendo as placas incubadas invertidas a 35 °C por 48 h (DOWNES e ITO, 2001).

### **2.2.2. Fungos filamentosos e leveduras**

A determinação de fungos filamentosos e leveduras foi realizada por plaqueamento em superfície em Ágar Batata Dextrose (BDA, Himedia®), acidificado e incubadas a 25 °C por 3 a 5 d (DOWNES e ITO, 2001).

### **2.2.3. Coliformes a 35 °C**

A contagem de coliformes a 35 °C foi realizada pela técnica de *Petrifilm*<sup>TM</sup> (3M®), segundo as recomendações da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h, enumerando-se como coliformes a 35 °C, as colônias vermelhas e azuis com gás.

#### **2.2.4. Psicrotróficos aeróbios**

Foi utilizada a contagem padrão de psicrotróficos aeróbios, seguido do plaqueamento em superfície em Ágar Padrão para Contagem (Himedia<sup>®</sup>), incubação das placas a  $7\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 7 a 10 d (DOWNES e ITO, 2001).

#### **2.2.5. Bactérias lácticas**

A contagem de bactérias lácticas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, sendo adicionado 1 mL da amostra e derramando-se parte da quantidade de Ágar MRS (Himedia<sup>®</sup>), em placas de Petri. Após secagem do meio, foi adicionada sobrecamada do mesmo ágar, visando a criação de atmosfera de 15 % de CO<sub>2</sub>, seguida de incubação a 30 °C por 5 d (DOWNES e ITO, 2001).

### **2.3. Análises físico-químicas**

As amostras de tomate cereja foram avaliadas quanto suas características físico-químicas. Estas análises visam identificar possíveis mudanças na qualidade das hortaliças após os tratamentos de sanitização e amostras não sanitizadas (controle).

#### **2.3.1. Acidez total titulável**

A determinação da acidez total titulável foi realizada segundo a técnica descrita pela AOAC (2005), por titulometria, utilizando-se 10 g de amostra homogeneizadas juntamente com 100 mL de água destilada. A titulação foi feita com solução de NaOH 0,1 N e fenolftaleína (1%) como indicador, procedendo-se as titulações, sob agitação. Os resultados foram expressos em % de ácido cítrico.

#### **2.3.2. pH**

Para determinação do pH das amostras de tomate cereja foram coletados aleatoriamente 10 g de tomate cereja que posteriormente foram homogeneizadas

juntamente com 100 mL de água destilada (IAL, 2004). As leituras foram feitas as leituras em pHmetro Digimed DM 20 (São Paulo, Brasil) .

### **3.3. Teor de sólidos solúveis**

O teor de sólidos solúveis foi determinado por refratometria, utilizando refratômetro digital portátil Atago® a 25 °C. As leituras foram feitas com três gotas de suco da polpa, feito com 10 g de tomate cereja homogeneizadas em 100 mL de água destilada. Os resultados foram expressos em °Brix (IAL, 2004).

#### **2.3.4. Cor instrumental**

A mudança da cor foi quantificada objetivamente por colorimetria, utilizando-se colorímetro Minolta Color Reader CR 10, sistema CIELAB, previamente calibrado com leitura direta de reflectância das coordenadas  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (relativa de verde a vermelho) e  $b^*$  (relativa de amarela a azul).

Para cada amostra, foi utilizada a média de três determinações em zonas aleatórias de cinco tomates cereja para cada repetição dos tratamentos em cada dia de avaliação.

A partir dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  determinou-se o ângulo Hue (°H) e Cromo por meio das seguintes equações:

$$^{\circ}\text{H} = \tan^{-1} \cdot (b^*/a^*) \quad \text{Croma} = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$$

#### **2.3.5. Firmeza**

A firmeza da polpa dos tomates cereja foi determinada no aparelho de ensaio de materiais INSTRON (Série 3367) utilizando-se sonda (3 mm de diâmetro), velocidade 5 mm/s com uma distância de penetração de 19 cm. Para cada tratamento foram analisados cinco tomates cereja, sendo realizadas duas medições em cada tomate. Os resultados foram expressos em Newton (N).

#### **2.3.6. Extração e análise de ácido ascórbico**

As condições utilizadas para extração de ácido ascórbico (AA) foram as otimizadas por Campos *et al.* (2009). Um porção de 5 g de amostra e 15 mL da solução extratora (ácido metafosfórico 3 %, ácido acético 8 %, ácido sulfúrico 0,3 N

e EDTA 1 mM) foram misturadas utilizando microtriturator (5 min), centrifugadas a 4000 rpm (1789 g) por 30 min e o sobrenadante foi completado para 25 mL com água ultrapura. O conteúdo de AA foi determinado de acordo com Campos *et al.* (2009) utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu) equipado com coluna cromatográfica RP-18 Lichrospher 100, 250 mm x 4 mm, 5 µm. O fluxo da fase móvel (1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 3,0) foi de 1mL/min e o tempo de corrida foi de 5 min. A eluição foi detectada utilizando detector de arranjo de diodos (Shimadzu SOD-M10 AVP), com comprimento de onda ajustado para 245 nm. A identificação do AA foi feita comparando-se os tempos de retenção obtidos para o padrão e para as amostras, analisados sob as mesmas condições. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras, utilizando o detector de arranjos de diodos. O padrão utilizado foi de L-ascorbato (Vetec, Brasil). A quantificação do composto nas amostras foi feita a partir da curva analítica e equação de regressão para ácido ascórbico ( $y = 3.870.141,085x + 883.647,051$   $R^2=0,997$ ).

### **2.3.7. Extração e análise de carotenóides**

O processo de extração dos carotenóides foi realizado de acordo com Rodriguez *et al.* (1976) com modificações. Cerca de 7 g de tomate cereja foram triturados em 60 mL de acetona (divididos em três volumes de 20 mL), filtrados a vácuo em funil de büchner e transferidos para 50 mL de éter de petróleo resfriado. Os extratos provenientes das amostras foram concentrados em evaporador rotativo na faixa de temperatura de 35 e 37 °C. Em seguida, os carotenóides foram dissolvidos em 25 mL de éter de petróleo, armazenados em frascos de vidro âmbar, em congelador (- 5 °C), para análise cromatográfica.

Carotenóides foram determinados pelas condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana *et al.* (1998) utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu) equipado com coluna cromatográfica RP-18 Phenomenex C18, 250 x 4.6 mm, 5µm. Fase móvel – metanol: acetato de etila: acetonitrila (50:40:10), com fluxo da fase móvel: 2 mL/minuto e tempo de corrida igual a 10 min. A eluição foi detectada utilizando detector de arranjo de diodos (Shimadzu SOD-M10 AVP), com comprimento de onda ajustado para 450 nm. A identificação dos carotenóides foi feita comparando-se os tempos de retenção obtidos

para os padrões e para as amostras, analisados sob as mesmas condições. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras, utilizando o detector de arranjos de diodos.

Os padrões utilizados foram de  $\beta$ -caroteno (Sigma Aldrich, EUA) e licopeno (Sigma Aldrich, EUA). A quantificação dos compostos nas amostras foi feita a partir das curvas analíticas e equações de regressão para licopeno ( $y = 6.844.138,9670x - 13.153,9821$   $R^2 = 0,9996$ ) e  $\beta$ -caroteno ( $y = 7.994.514x + 1.277,372$   $R^2 = 0,999$ ).

## 2.4. Análise Estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e um controle (sem sanitizar) em duplicata com três repetições. Para a avaliação da eficiência dos tratamentos de sanitização no início e ao fim do período de armazenamento, foi aplicado o teste t Student para comparar cada tratamento. Para comparar os tratamentos entre si, em cada período, os resultados das contagens ( $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas estatisticamente pelo Teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

Foi realizado experimento para acompanhamento da vida de prateleira dos tomates cereja após os tratamentos de sanitização propostos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo 8 tratamentos (dicloroisocianurato de sódio a  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , detergente a base de tensoativos, ácido láctico 1%, nanopartículas de prata  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , ultrassom a 40 kHz, e ultrassom associado ao detergente comercial, ultrassom associado a ácido láctico 1%, e ultrassom associado a nanopartículas de prata  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) mais um tratamento controle (não sanitizado), sendo realizado para cada tratamento três repetições.

Para a qualidade físico-química e nutricional foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas sendo os tratamentos na parcela e o tempo na subparcela, com três repetições, sendo os resultados dos parâmetros analisados pela ANOVA, em caso de p com valor significativo, as médias comparadas estatisticamente pelo Teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do Statistical Analysis System (SAS Institute, North Carolina, USA), versão 9.1, licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Análises microbiológicas

Após os tratamentos de sanitização, a contagem de mesófilos aeróbios reduziu entre 0,27 e 2,33 log UFC·g<sup>-1</sup> em relação a amostras de tomate cereja não sanitizadas (Figura 2).

No décimo dia de armazenamento a 7 °C foram observadas contagens de 6,83 log UFC·g<sup>-1</sup> de mesófilos aeróbios nos tomates sanitizados por ultrassom 40 kHz. O tratamento com ultrassom não reduziu 1,0 log UFC·g<sup>-1</sup>, resultado que foi semelhante ao observado por São José e Vanetti (2012) utilizando ultrassom com frequência de 45 kHz por 10 min. Susana-Rivera *et al.* (2011) observaram eliminação de 1,0 log UFC·g<sup>-1</sup> de mesófilos aeróbios ao aplicar ultrassom para descontaminar trufas frescas *Tuber aestivum*. As limitações para a redução de micro-organismos a partir da superfície de vegetais pode ser relacionada com a presença da cutícula hidrofóbica composta por várias camadas cutina e moléculas de cera que cobrem a epiderme de frutas e hortaliças (VELÁZQUEZ *et al.*, 2009).

A associação de agentes químicos com ultrassom promoveu reduções de 1,73 a 2,11 log UFC·g<sup>-1</sup> o que indica que o ultrassom tem potencial para ser utilizado para a inativação de bactérias, mas que deve ser aplicado em associação com outros agentes sanitizantes. Os tratamentos com detergente a base de tensoativos, ácido láctico 1 %, e estes agentes sanitizantes associados ao ultrassom e a aplicação do ultrassom associado a nanopartículas de prata promoveram redução de mesófilos aeróbios logo após a sanitização e foi observada manutenção da redução até o último dia do armazenamento (p<0,05).

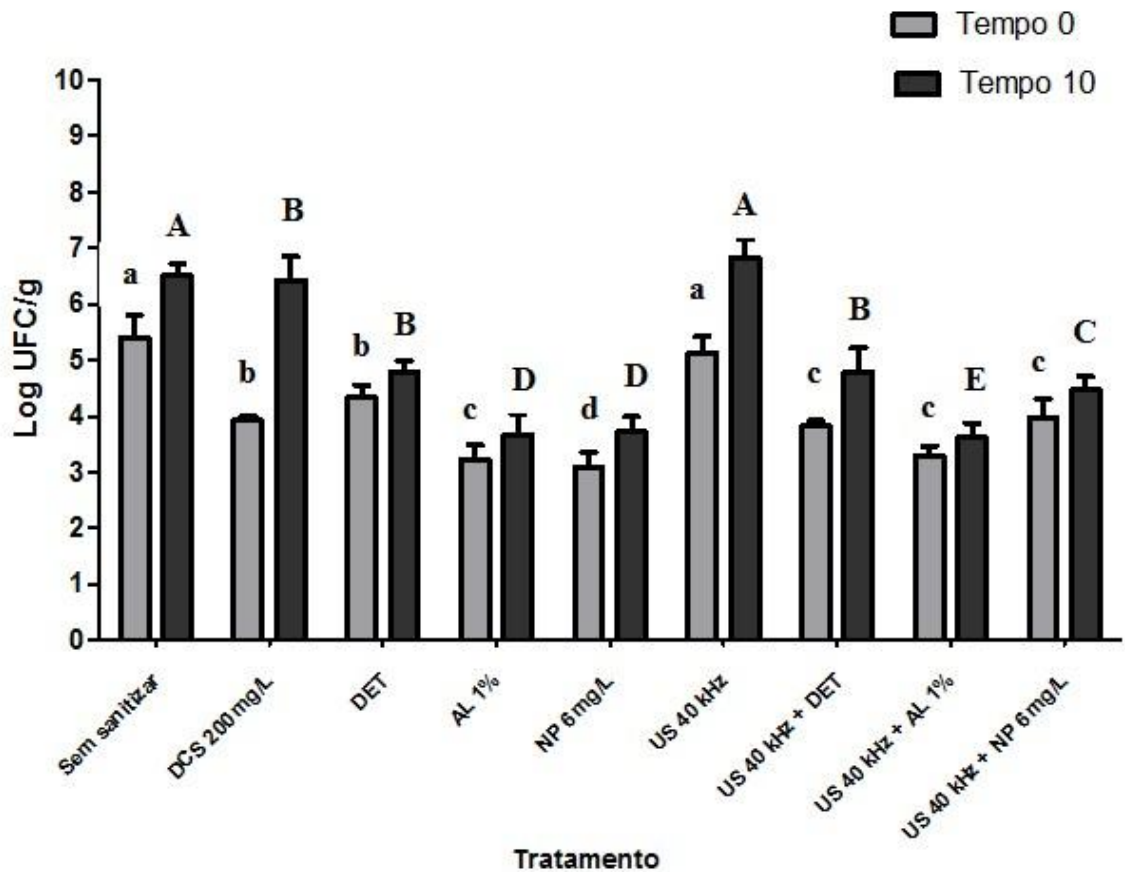


Figura 2: Contagem expressa em Log UFC·g<sup>-1</sup> de mesófilos aeróbios após a sanitização e no décimo dia de armazenamento a 7°C. Tratamentos indicados com mesma letra minúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 0. Tratamentos indicados com mesma letra maiúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 10.

O ácido láctico 1% e nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup> reduziram de 2,18 e 2,33 log UFC·g<sup>-1</sup> a contaminação de mesófilos aeróbios, respectivamente. Gopal *et al.* (2010) investigaram a utilização de prata (a partir de nitrato de prata) e prata eletroquimicamente gerada em alface minimamente processada, e verificaram que a sanitização com prata foi mais eficaz do que soluções cloradas sob diferentes micro-organismos como fungos filamentosos e leveduras, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp.

Amostras de tomates cereja não tratadas apresentaram 4,70 e 6,13 log UFC·g<sup>-1</sup> de fungos filamentosos e leveduras logo após a sanitização e ao final do período de armazenamento, respectivamente (Figura 3). Frutas e hortaliças também podem ser contaminadas por fungos filamentosos e leveduras. Após a colheita,

fungos podem contaminar e deteriorar materiais vegetais e produzir metabólitos tóxicos. Alguns deles produzem micotoxinas, enquanto crescem sobre estes produtos, e outros são riscos para a saúde do consumidor por serem patogênicos (TOURNAS, 2005).

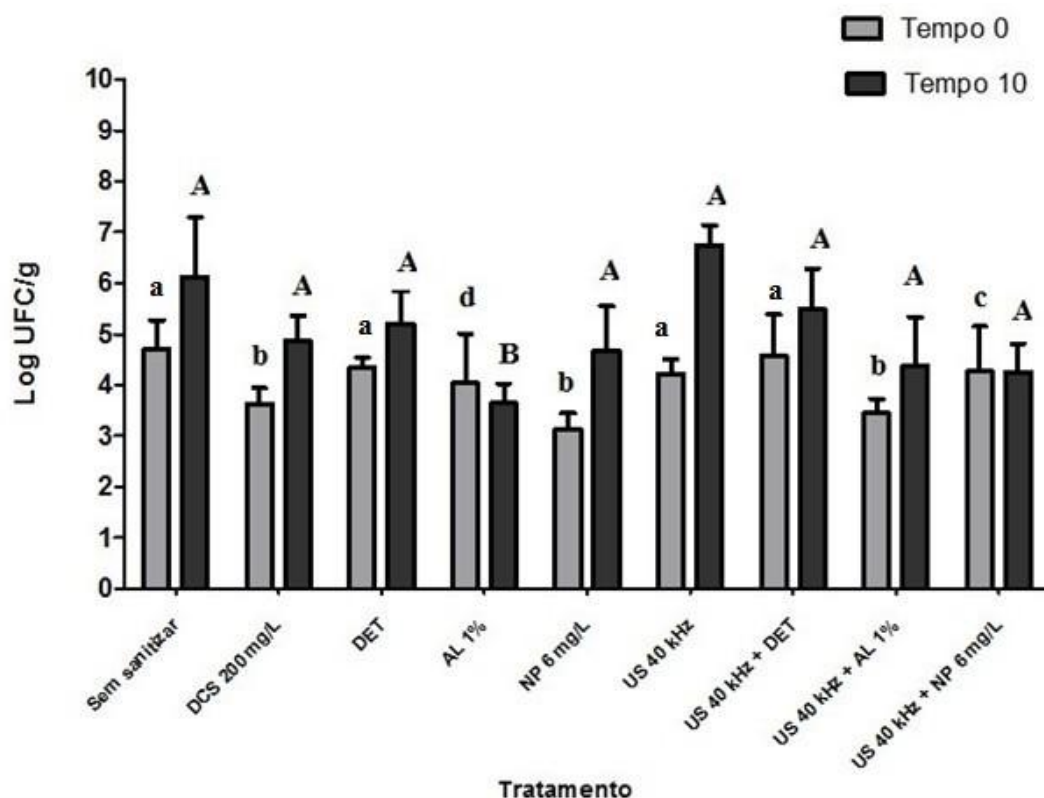


Figura 3: Contagem expressa em Log UFC·g<sup>-1</sup> de fungos filamentosos e leveduras após a sanitização e no décimo dia de armazenamento a 7°C. Tratamentos indicados com mesma letra minúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 0. Tratamentos indicados com mesma letra maiúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 10.

Os tratamentos estudados promoveram reduções de 0,37 a 1,58 log UFC·g<sup>-1</sup> de fungos filamentosos e leveduras. No tempo zero do armazenamento, as maiores reduções observadas na contagem de fungos filamentosos e leveduras foram 1,58 e 1,26 log UFC·g<sup>-1</sup>, registradas em amostras de tomates cerejas tratadas com nanopartículas de prata e ultrassom associado a ácido láctico 1 %, respectivamente.

A menor redução observada, 0,37 log UFC·g<sup>-1</sup>, para a contagem de fungos filamentosos e leveduras foi registrada após o tratamento com ultrassom aplicado de forma isolada.

Amostras não sanitizadas apresentaram contagem  $5,03 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  de coliformes a  $35^\circ\text{C}$ . Dentre os tratamentos propostos destacaram-se o uso de ácido láctico 1%, nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e ultrassom associado a estes dois sanitizantes que promoveram reduções entre 2,06 a  $2,86 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  (Figura 4).

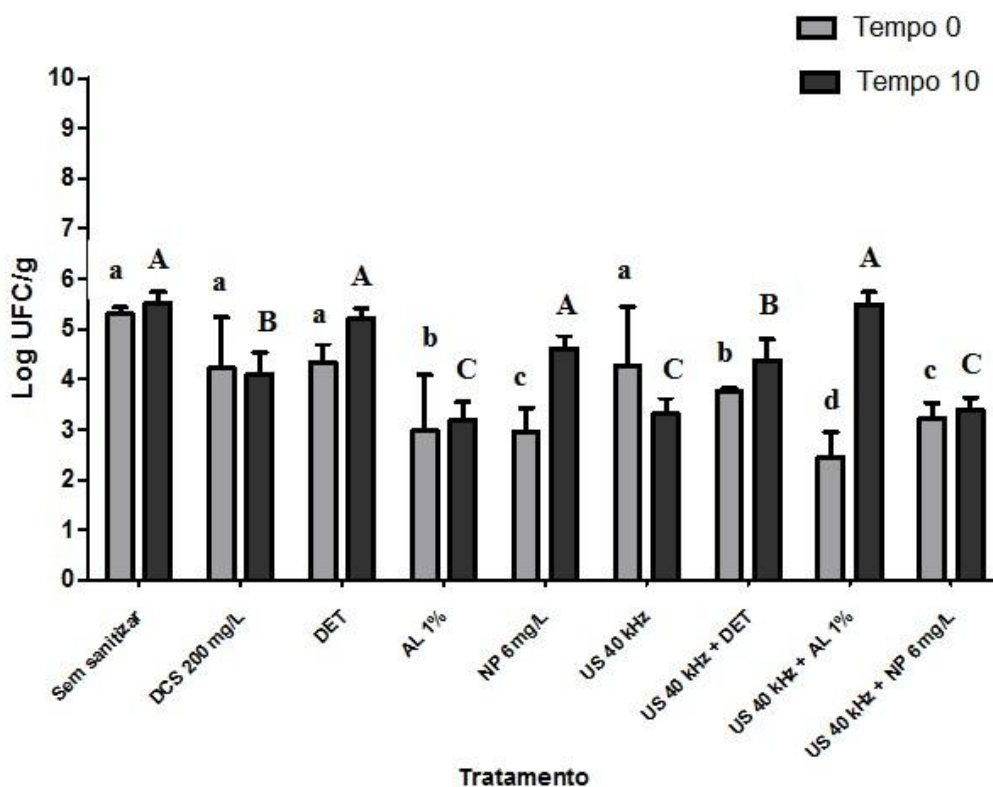


Figura 4: Contagem expressa em  $\text{Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  de coliformes a  $35^\circ\text{C}$  após a sanitização e no décimo dia de armazenamento a  $7^\circ\text{C}$ . Tratamentos indicados com mesma letra minúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 0. Tratamentos indicados com mesma letra maiúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 10.

Oliveira *et al.* (2011) detectaram coliformes na maioria das amostras de hortaliças minimamente processadas com populações superiores a  $3 \log \text{NMP}\cdot\text{g}^{-1}$ . A presença destes micro-organismos pode também contribuir para a diminuição da vida útil dos produtos (BERBARI *et al.*, 2001). A legislação brasileira, RDC nº 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) estipula o valor de  $10^2 \text{ NMP}\cdot\text{g}^{-1}$  para amostras indicativas de hortaliças sanitizadas.

Huang e Chen (2011) ao estudarem diferentes tratamentos de sanitização em espinafre, observaram que ácido láctico 1% reduziu de  $1,9 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  de *E. coli* O157:H7.

A aplicação do ultrassom de forma isolada mostrou-se ineficiente para inativação de coliformes ao provocar redução de apenas 0,27 log UFC·g<sup>-1</sup>. O uso de detergente também foi relativamente ineficiente na redução da contaminação e alcançou redução 0,64 log UFC·g<sup>-1</sup>. Entretanto, a combinação deste com o ultrassom provocou incremento na inativação ocasionando redução igual 1,53 log UFC·g<sup>-1</sup>, sendo ainda observado efeito sinérgico entre os tratamentos associados. A intensa pressão gerada durante o uso do ultrassom pode contribuir para a penetração de oxidantes químicos através da membrana celular e o processo de cavitação auxilia na desagregação de micro-organismos, o que culmina no aumento da eficiência do sanitizante (GOGATE e KABADI, 2009).

Os tratamentos de sanitização estudados provocaram redução de 0,41 a 2,64 log UFC·g<sup>-1</sup> na contagem de bactérias lácticas (Figura 5). As contagens obtidas após sanitização com tratamentos com ácido láctico 1 %, ultrassom e ultrassom associado a nanopartículas de prata não diferiram (p>0,05) estatisticamente das contagens de amostras de tomates não sanitizadas.

Maior inativação de bactérias lácticas foi obtida pelos tratamentos com dicloroisocianurato de sódio 200 mg·L<sup>-1</sup>, ultrassom associado a ácido láctico 1% e nanopartículas de prata 6 mg·L<sup>-1</sup> que provocaram reduções de 2,02, 2,14 e 2,64, respectivamente. Como estes tratamentos proporcionaram reduções na contagem estatisticamente iguais, sugere a possível substituição do tratamento com solução de dicloroisocianurato de sódio por aplicação do ultrassom associado ao ácido láctico ou aplicação de nanopartículas de prata.

As contagens obtidas após sanitização com tratamentos com ácido láctico 1%, ultrassom e ultrassom associado a nanopartículas de prata não diferiram estatisticamente das contagens de amostras de tomates não sanitizadas (p > 0,05).

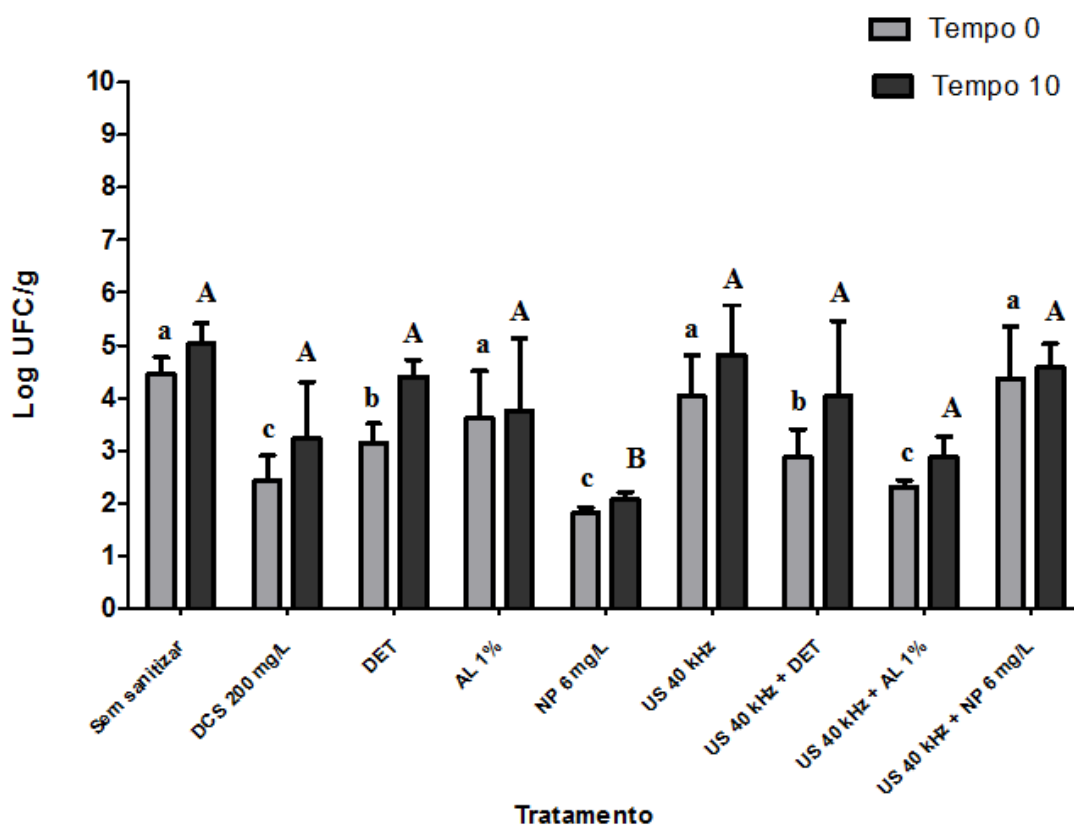


Figura 5: Contagem expressa em Log UFC·g<sup>-1</sup> de bactérias lácticas após a sanitização e no décimo dia de armazenamento a 7°C. Tratamentos indicados com mesma letra minúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 0. Tratamentos indicados com mesma letra maiúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 10.

A contagem média de psicrotróficos logo após a sanitização foi 3,90 a 6,29 log UFC·g<sup>-1</sup> e ao final do armazenamento, os tomates cerejas sanitizados por diferentes tratamentos alcançaram contagens entre 5,07 e 7,70 log UFC·g<sup>-1</sup> (Figura 6). Oliveira *et al.* (2011) avaliaram a microbiota contaminante de hortaliças minimamente processadas e observaram grandes populações de bactérias aeróbias psicrotróficas nas amostras, o que sugere uma curta vida de prateleira do produto. Altas contagens destes micro-organismos podem estar associadas a falta de qualidade higiênica, provavelmente, devido à utilização de matérias-primas com contaminação elevada, higiene inadequada durante o processamento e /ou temperatura inadequada de armazenamento (BRUNO *et al.*, 2005).

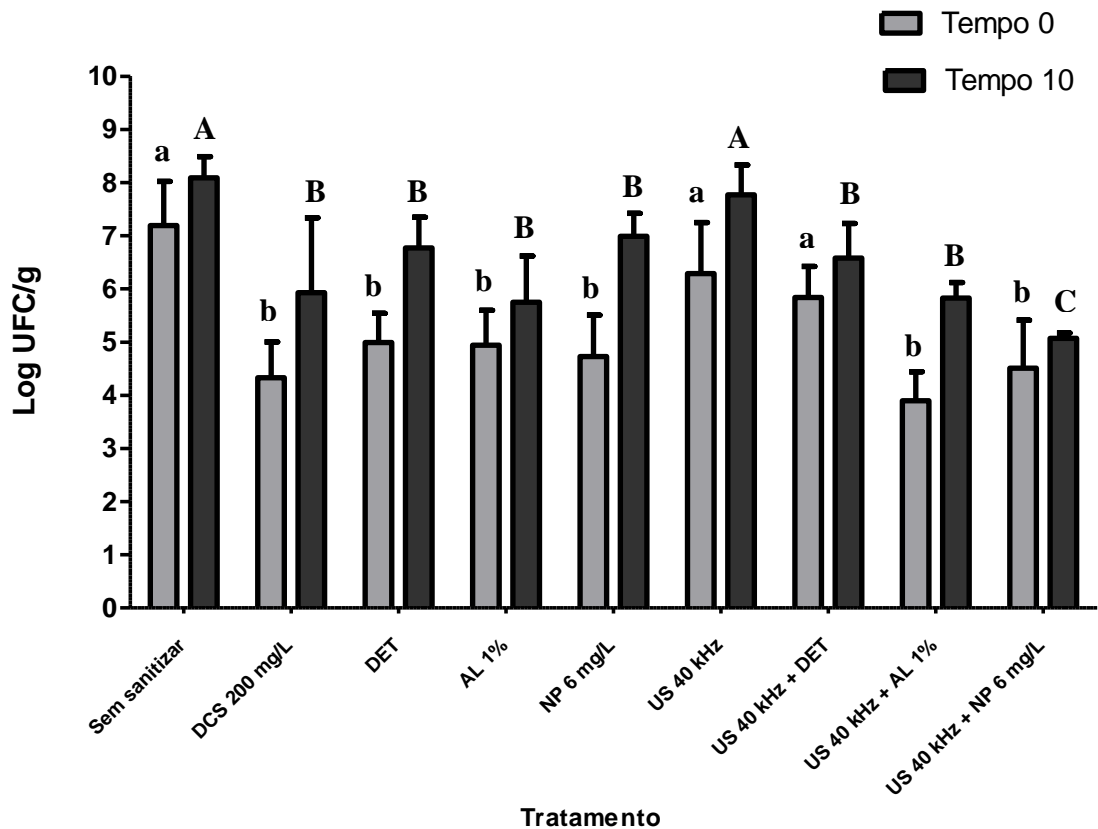


Figura 6: Contagem expressa em Log UFC·g<sup>-1</sup> de psicrotróficos aeróbios após a sanitização e no décimo dia de armazenamento a 7°C. Tratamentos indicados com mesma letra minúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 0. Tratamentos indicados com mesma letra maiúscula não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si no tempo 10.

Apesar das altas contagens observadas para alguns micro-organismos nas amostras de tomate cereja, mediante inspeção visual e olfativa subjetiva todas as amostras tratadas pareceram adequadas para consumo, exceto as tratadas com nanopartículas de prata que apresentaram exsudato e cheiro não característico ao final do armazenamento.

#### 4.2. Análises físico-químicas

Os valores de pH não variaram significativamente ( $p > 0,05$ ) em razão dos tratamentos de sanitização, do tempo e da interação entre tempo e tratamentos. O acompanhamento desse parâmetro de qualidade após a sanitização e durante o

período de armazenamento é importante, pois os sanitizantes podem influenciar os valores de pH das hortaliças, provocando alterações que podem acelerar a deterioração do produto (RICO *et al.*, 2007).

Os valores de acidez total titulável (ATT), conteúdo de sólidos solúveis totais (SST), e a razão SST/ATT apresentaram influencia significativa em relação ao tempo de armazenamento. Esta variável influenciou significativamente nos valores de ATT, sendo o modelo quadrático da regressão ( $y = 0,01965x^2 + 0,57070$ ,  $R^2 = 0,87$ ) o que melhor representou os resultados. Para SST, o modelo linear e o quadrático não se adequaram. Para SST/ATT, o modelo quadrático de regressão ( $y = -0,41861x^2 + 12,42302$ ,  $R^2 = 0,99$ ) foi o que melhor representou os resultados. Adekunte *et al.* (2010) ao avaliarem o efeito do ultrassom em suco de tomate, em diferentes intensidades e tempo, também não observaram alteração nos valores de pH, ATT e SST.

Na Tabela 1 estão apresentados de pH, ATT, SST e relação SST/ATT por tratamento.

Tabela 1 – Valores médios\* e desvio padrão de pH, ATT, SST e relação SST/ATT de tomates cerejas submetidos a diferentes tratamentos de sanitização armazenados por 10 dias a 7 °C.

Tratamento	pH	ATT (% ácido cítrico)	SST (° Brix)	SST/ATT
<b>Sem sanitizar</b>	4,30 ± 0,33	0,64 ± 0,23	6,59 ± 1,57	10,30 ± 1,36
<b>DCS 200 mg·L<sup>-1</sup></b>	4,27 ± 0,29	0,60 ± 0,22	6,35 ± 1,11	10,58 ± 1,37
<b>DET</b>	4,30 ± 0,37	0,63 ± 0,13	6,22 ± 1,33	9,87 ± 1,44
<b>AL 1%</b>	4,29 ± 0,35	0,62 ± 0,17	6,05 ± 1,04	9,75 ± 1,95
<b>NP 6 mg·L<sup>-1</sup></b>	4,31 ± 0,34	0,63 ± 0,18	5,83 ± 0,84	9,25 ± 1,64
<b>US 40 kHz</b>	4,30 ± 0,35	0,66 ± 0,18	6,23 ± 1,11	9,43 ± 1,12
<b>US 40 kHz + DET</b>	4,33 ± 0,32	0,68 ± 0,20	5,77 ± 0,89	8,48 ± 2,98
<b>US 40 kHz + AL 1%</b>	4,26 ± 0,33	0,60 ± 0,17	6,46 ± 1,24	10,67 ± 2,95
<b>US 40 kHz + NP 6 mg·L<sup>-1</sup></b>	4,31 ± 0,35	0,62 ± 0,21	5,66 ± 0,79	9,13 ± 3,11

\*Médias não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de ATT variaram de 0,60 a 0,68 % de ácido cítrico. Este é um parâmetro envolvido com a apreciação do estado de conservação de um produto

alimentício, já que, na maioria das vezes, a decomposição do alimento quase sempre altera a concentração de íons de hidrogênio (IAL, 2004), além de influenciar as características sensoriais dos alimentos. Esse parâmetro pode variar em função do grau de maturação e das condições de crescimento (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Cao *et al.* (2010) ao tratar morangos com ultrassom em diferentes frequências verificaram que o conteúdo de ATT diminuiu com o tempo de armazenamento e os frutos tratados com ultrassom 40 kHz tenderam a ter maior valor de ATT em comparação ao com o controle da fruta.

Os valores médios de SST para os tomates cerejas corroboram com o valor médio observado por Pinho (2011) que registrou 6,1 °Brix em tomates cereja cultivados no sistema convencional.

O valor de SST é um índice refratométrico que indica a proporção (%) de sólidos dissolvidos em solução. É a soma dos açúcares (sacarose e hexoses), ácidos (citrato e malato) e outros componentes em menor proporção (fenóis, aminoácidos, pectinas solúveis, ácido ascórbico e sais minerais) na polpa do fruto de tomate (BECKLES, 2012). Segundo ABHorticultura (2011), o tomate cereja possui entre 9 e 12 °Brix, o que caracteriza maior concentração de sólidos solúveis totais, principalmente os açúcares. Cao *et al.* (2010) avaliaram o efeito do ultrassom nos valores de SST e verificaram diminuição em todos os tratamentos após a colheita de morangos. Estes mesmos autores observaram que o tratamento com ultrassom 40 kHz inibiu de forma significativa o declínio do SST após seis dias de armazenamento.

No presente trabalho, a relação SST/ATT de tomates cereja foram mais baixos nos tratamentos com ultrassom associados aos sanitizantes químicos. Esta relação é um dos índices mais utilizados para determinar a maturação e a palatabilidade dos frutos e correspondente aos conteúdos de açúcares e de acidez dos frutos, sendo um parâmetro apropriado para medir a percepção de sabor pelo consumidor (BALIBREA *et al.*, 2006; SUAREZ *et al.*, 2008; BECKLES, 2012). Dentro da fruta, a relação SST/ATT varia, sendo menor no lóculo comparado ao pericarpo, e dentro do estágio de desenvolvimento do fruto, desde decréscimo na fase final de maturação, com as condições de crescimento que são influenciados pelo metabolismo (BECKLES, 2012). Javanmardi e Kubota (2006) observaram que as

médias de SST de tomates armazenados em temperatura ambiente e em baixa temperatura variaram de 5,0 a 5,1%.

Neste estudo, o tratamento dos sanitizantes, tempo de armazenamento e a interação entre este e os tratamentos não foram significativos para alteração dos parâmetros de cor avaliados (Tabela 2).

A cor dos alimentos é um dos atributos mais atrativos para o consumidor e pode variar entre as espécies e mesmo entre cultivares. Os produtos de cor forte e brilhante são os preferidos. As modificações na coloração dos frutos, com a maturação são devido tanto a processos de degradação como a processos de síntese. Estas modificações correspondem a um dos principais critérios de julgamento para a identificação do amadurecimento de frutas e de hortaliças (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Tabela 2– Valores médios\* e desvio padrão dos parâmetros de cor de tomates cerejas submetidos a diferentes tratamentos de sanitização armazenados por 10 dias a 7 °C.

Tratamento	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Hue	Croma
<b>Sem sanitizar</b>	29,19 ± 1,04	19,41 ± 2,66	27,80 ± 1,66	55,17 ± 4,00	33,98 ± 2,07
<b>DCS 200 mg·L<sup>-1</sup></b>	29,29 ± 1,01	17,93 ± 2,71	27,40 ± 1,15	56,95 ± 3,94	32,82 ± 1,85
<b>DET</b>	29,78 ± 1,19	16,78 ± 2,80	26,94 ± 3,94	57,95 ± 5,20	31,88 ± 3,76
<b>AL 1%</b>	29,80 ± 1,12	18,10 ± 3,69	27,38 ± 2,02	56,78 ± 5,16	32,95 ± 2,95
<b>NP 6 mg·L<sup>-1</sup></b>	29,59 ± 1,10	17,71 ± 3,15	27,11 ± 1,94	57,01 ± 4,75	32,49 ± 2,56
<b>US 40 kHz</b>	28,99 ± 0,76	17,12 ± 2,93	27,07 ± 1,22	57,89 ± 4,10	32,10 ± 2,15
<b>US 40 kHz + DET</b>	28,97 ± 1,08	16,50 ± 3,09	25,42 ± 0,72	57,27 ± 4,74	30,41 ± 1,95
<b>US 40 kHz + AL 1%</b>	28,95 ± 0,73	17,77 ± 5,73	26,45 ± 1,53	56,82 ± 6,86	32,13 ± 4,25
<b>US 40 kHz + NP 6 mg·L<sup>-1</sup></b>	29,10 ± 0,86	16,90 ± 3,09	25,93 ± 1,12	57,13 ± 4,54	31,05 ± 2,14

\*Médias não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Adekunte *et al.* (2010) observaram redução nos valores dos parâmetros de cor  $L^*$   $a^*$   $b^*$  em suco de tomate tratados com ultrassom em diferentes condições e sugeriram que as mudanças de cor observadas podem ter sido causados por cavitação, que envolve diferentes reações físicas, químicas ou biológicas. No presente estudo, por tratar-se de sanitização do tomate cereja intacto, a cavitação pode ter tido menor efeito na cor. A coloração do tomate está relacionada principalmente à presença de pigmentos carotenoides, como o licopeno e é

influenciada pelo processamento (LIANFU e ZELONG, 2008). Sagong *et al.* (2011), apesar de avaliarem o efeito de ácido láctico 1% associado ao ultrassom em outra hortaliça, alfaces orgânicos frescos, também não observaram alteração significativa nos valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  em 7 dias de armazenamento a 4 °C.

Os valores de firmeza não alteraram significativamente ( $p>0,05$ ) em função do tratamento, do tempo e interação entre tratamento com o tempo (Tabela 3).

Tabela 3– Valores médios e desvio padrão de firmeza (N) de tomates cerejas submetidos a diferentes tratamentos de sanitização armazenados por 10 dias a 7 °C.

Tratamento	Firmeza (N)	Redução da Firmeza (%)
Sem sanitizar	2,63 ± 0,43	-
DCS 200 mg·L <sup>-1</sup>	2,32 ± 0,72	11,78%
DET	2,33 ± 0,60	11,40%
AL 1%	2,21 ± 0,58	15,96%
NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	2,56 ± 0,75	2,66%
US 40 kHz	2,07 ± 0,75	21,29%
US 40 kHz + DET	1,70 ± 0,66	35,36%
US 40 kHz + AL 1%	1,75 ± 0,55	33,46%
US 40 kHz + NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	1,72 ± 0,63	34,60%

\*Médias não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade. Redução da Firmeza – relação entre o valor médio de firmeza dos tratamentos de sanitização/ valor médio de firmeza de amostras sem sanitizar.

As alterações não significativas da firmeza dos tomates cereja, após os diferentes tratamentos de sanitização aplicados e durante o período de armazenamento indicam manutenção da estrutura do tomate. A firmeza é um atributo crítico de qualidade na aceitabilidade de frutas e hortaliças pelo consumidor (CAO *et al.*, 2010) e pode apresentar decréscimo pela perda do turgor celular devido a perda de água durante o armazenamento (AKBAS e OLMEZ, 2007).

Apesar da alteração da firmeza entre os tratamentos não ter sido estatisticamente significativa pode ser observado que os valores de firmeza foram menores nos tratamentos com ultrassom em relação a aplicação de agentes químicos. Cao *et al.* (2010) observaram que a aplicação do ultrassom 40 kHz inibiu marcadamente o amolecimento de morangos mantendo altos valores de firmeza

durante o armazenamento e relacionaram a manutenção da firmeza com a inativação das enzimas poligalacturonase e pectinametilesterase. Yang *et al.* (2011) avaliaram o efeito do tratamento com ultrassom aplicado sozinho e associado ao ácido salicílico durante 10 min em pêssegos e não observaram alteração da firmeza após 6 dias de armazenamento a 20 °C. Estudos que avaliaram a influência de sanitizantes químicos na firmeza de frutas e hortaliças (AKBAS e OLMEZ, 2007; SAGONG *et al.*, 2011; ALEXANDRE *et al.*, 2012), observaram manutenção dessa característica.

Frutas e hortaliças perdem firmeza e frescor característicos quando são mantidas em armazenamento sob refrigeração, até mesmo por períodos curtos. Essas alterações são aceleradas quando as células são injuriadas, como no descascamento e fatiamento (BEERLI, 2004). Neste trabalho, a manutenção da firmeza pode ter sido favorecida pela sanitização dos tomates cereja intactos. Esse é um importante resultado para o processamento deste produto. Um tratamento de sanitização ideal deve ser simples e de fácil aplicação, sem causar danos físicos e manter as características sensoriais do alimento (SUSANA-RIVERA, 2011).

Além das características de qualidade já discutidas, a avaliação de perdas no conteúdo de carotenoides e ácido ascórbico após os tratamentos de sanitização também é importante. O perfil cromatográfico obtido para licopeno e  $\beta$ -caroteno mostra uma eficiente separação, indicando que a quantificação dos teores nas amostras foi realizada de forma segura (Figura 6).

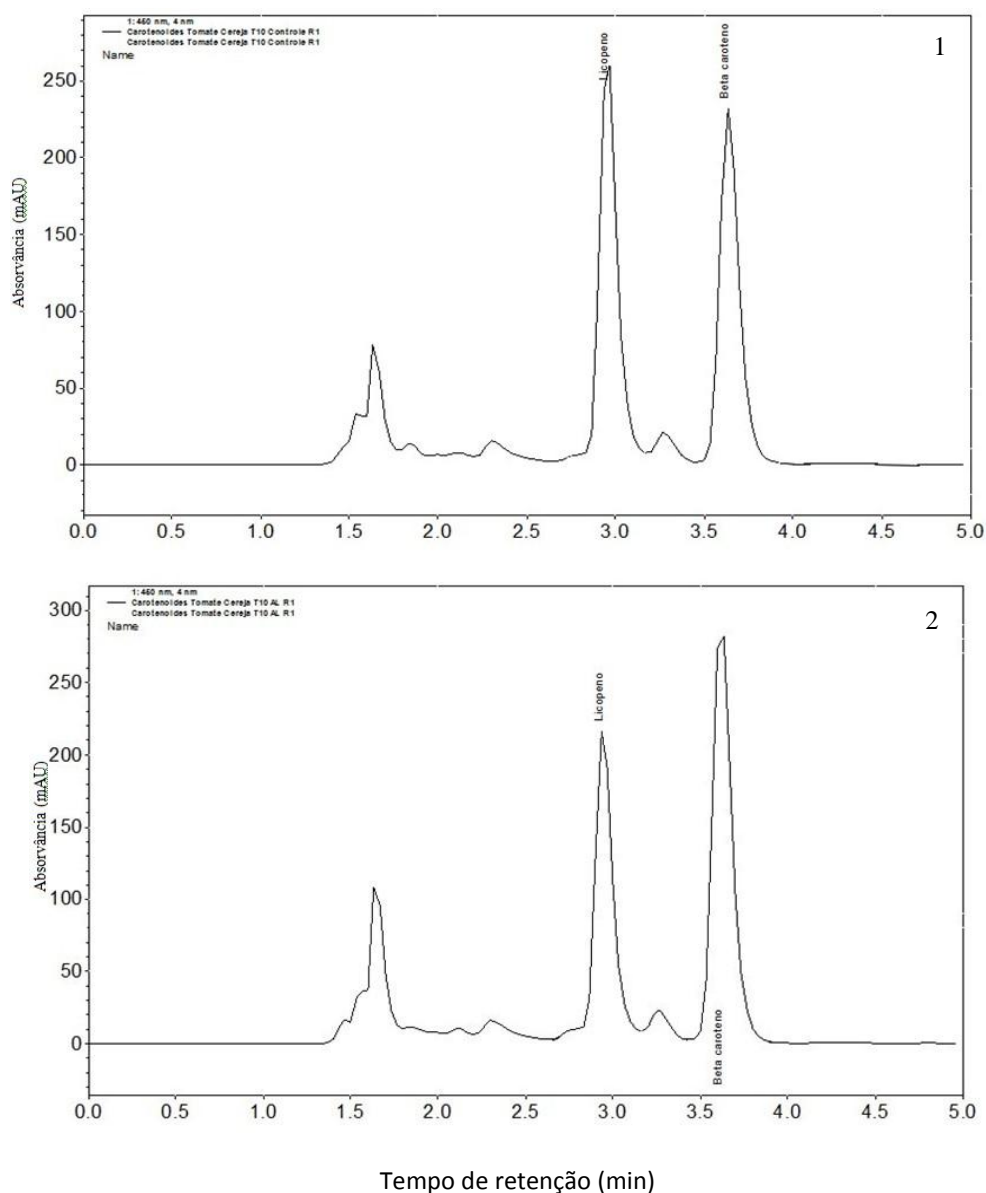


Figura 6 – Cromatogramas obtidos da análise cromatográfica líquida de alta eficiência de licopeno e  $\beta$ -caroteno em tomate cereja sem sanitizar (1) e tomate cereja tratado por 5 min com ácido láctico 1% após 10 dias de armazenamento (2).

O conteúdo de licopeno e  $\beta$ -caroteno em tomates cerejas sanitizados não alteraram significativamente quando analisadas em relação aos tratamentos de sanitização, tempo, e a interação destes com o tempo (Tabela 4).

Tabela 4– Valores médios\* e desvio padrão dos teores de licopeno e  $\beta$ -caroteno de tomates cerejas submetidos a diferentes tratamentos de sanitização armazenados por 10 dias a 7 °C.

<b>Tratamento</b>	<b>Licopeno (<math>\mu\text{g}/100\text{g}</math>)</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno (<math>\mu\text{g}/100\text{g}</math>)</b>
<b>Sem sanitizar</b>	771,82 $\pm$ 180,47	646,43 $\pm$ 102,72
<b>DCS 200 mg·L<sup>-1</sup></b>	869,24 $\pm$ 221,42	704,94 $\pm$ 122,04
<b>DET</b>	615,26 $\pm$ 186,47	634,61 $\pm$ 118,59
<b>AL 1%</b>	737,31 $\pm$ 216,39	635,95 $\pm$ 99,93
<b>NP 6 mg·L<sup>-1</sup></b>	682,81 $\pm$ 207,61	643,81 $\pm$ 119,75
<b>US 40 kHz</b>	797,44 $\pm$ 196,56	636,47 $\pm$ 120,09
<b>US 40 kHz + DET</b>	653,77 $\pm$ 233,90	651,64 $\pm$ 132,59
<b>US 40 kHz + AL 1%</b>	730,44 $\pm$ 205,15	630,11 $\pm$ 182,98
<b>US 40 kHz + NP 6 mg·L<sup>-1</sup></b>	831,54 $\pm$ 207,54	675,78 $\pm$ 92,56

\*Médias não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A degradação do licopeno pode ocorrer em razão das condições de processamento e armazenamento que ocasionam a isomerização e oxidação deste composto. Fatores ambientais como oxigênio, luz e temperatura têm importante ação nesse processo (DEMIRAY *et al.*, 2013). O ultrassom por meio da cavitação gera radicais livres, energia mecânica e *hot spots* (regiões de alta temperatura e alta pressão) que podem contribuir para redução do conteúdo deste nutriente em tomates cerejas tratados. Entretanto, essa alteração não foi observada o que indica que valores de retenção elevados foram obtidos e que os tratamentos de sanitização aplicados parecem ter preservado o conteúdo de licopeno e  $\beta$ -caroteno.

Os carotenóides contribuem para a formação da cor no tomate e, sua presença na dieta está associada principalmente com os benefícios à saúde humana. Principais carotenóides presentes no tomate incluem licopeno, responsável pela cor vermelha do tomate e  $\beta$ -caroteno. A manutenção do conteúdo de licopeno é importante, pois se trata um pigmento com propriedades bioativas relacionadas frequentemente a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias (PORRINI *et al.*, 2005; SINGH e GOYAL, 2008), antimutagênica e anticarcinogênica e o  $\beta$ -caroteno tem uma atividade pró-vitamina A (DEMIRAY *et al.* 2013).

Estudos com outros alimentos, que avaliaram outros compostos bioativos

(ALEXANDRE *et al.* , 2012, TIWARI *et al.* 2010), mostraram que o ultrassom permite maior retenção do teor de antocianinas totais e os autores sugerem que a degradação pode ocorrer devido a reações de oxidação promovidas pela interação de radicais livres formados durante a sonicação.

Anese *et al.* (2013) observaram que a concentração de licopeno total de polpa de tomate não foi afetada pelo processamento com ultrassom sendo que os valores do conteúdo total variaram entre  $5,1 \pm 0,8$  e  $6,6 \pm 1,1$  mg/grama de massa seca, em amostras de tomate não tratados e processados por ultrassom, respectivamente. Tratamentos térmicos leves em tomate durante a preparação dos alimentos, tais como aquecimento, fervura e cozimento não alteram significativamente os níveis de carotenóides em tomate e outras hortaliças (ANESE *et al.*, 2013).

O armazenamento em temperaturas baixas inibe a formação de licopeno (JAVANMARDI e KUBOTA, 2006), dessa forma a manutenção dos valores de licopeno no presente estudo podem estar associados também a condição de armazenamento estabelecida que foi a 7 °C.

É importante destacar a manutenção do conteúdo de licopeno e  $\beta$ -caroteno após a sanitização por diferentes tratamentos, pois se sabe que estes carotenoides tem relação direta com a coloração apresentada pelos tomates. Assim, corrobora com os resultados obtidos nas análises dos parâmetros de cor que não apresentaram alterações significativas para os tratamentos de sanitização ao longo do armazenamento.

Apesar de vários estudos (SASS-KISS *et al.*, 2005; KOTÍKOVÁ *et al.*, 2011; ILAHY *et al.*, 2011) com tomate indicarem maior proporção de licopeno do que  $\beta$ -caroteno, o presente estudo indicou proximidade do conteúdo desses dois carotenóides. Esse resultado pode estar relacionado a diferenças entre variedades e/ou localização geográfica e clima que podem promover a produção de licopeno em maior ou menor proporção do que dos demais carotenoides (KOTÍKOVÁ *et al.*, 2011).

O perfil cromatográfico do ácido ascórbico mostra uma eficiente separação, indicando que a quantificação dos teores nas amostras foi realizada de forma segura (Figura 7).

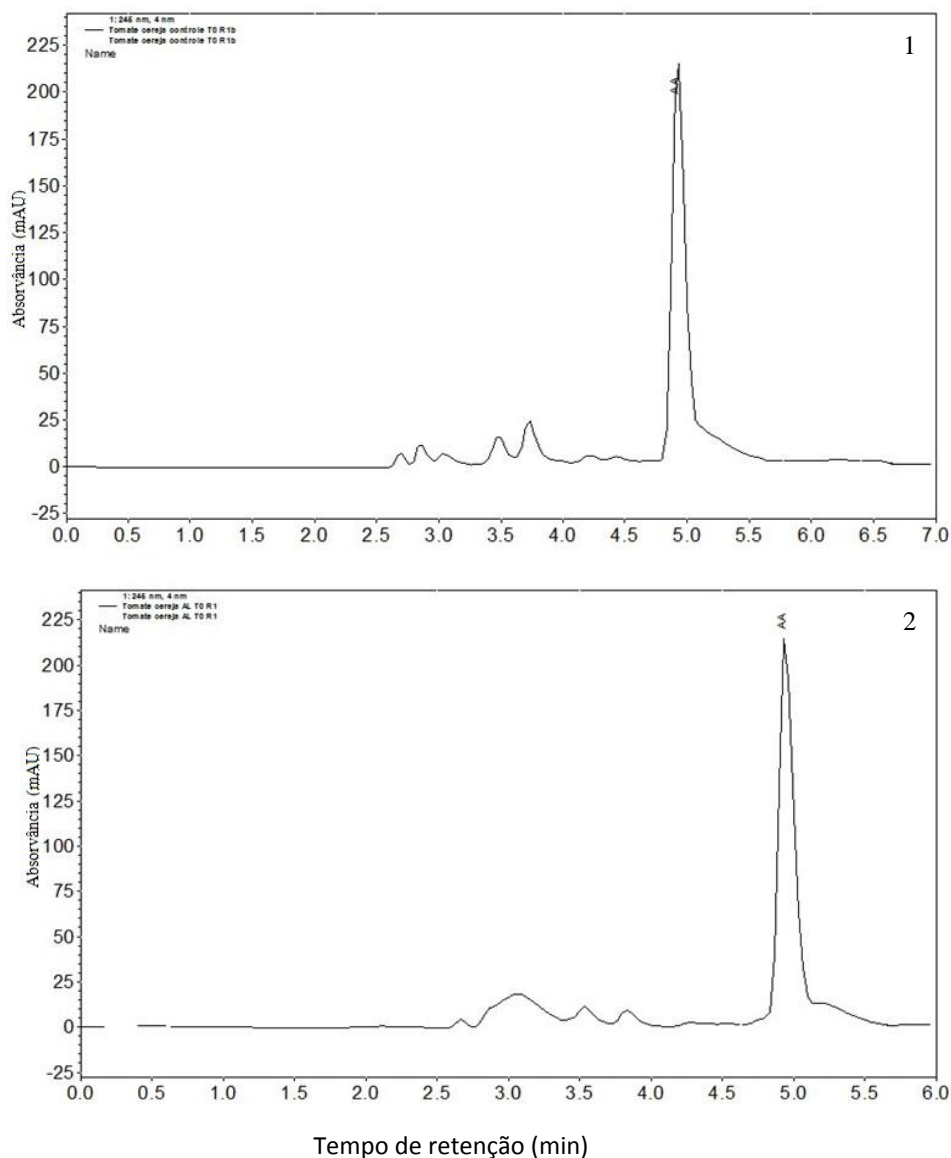


Figura 7 – Cromatogramas obtidos da análise cromatográfica líquida de alta eficiência de ácido ascórbico (AA) em tomate cereja sem sanitizar (1) e tomate cereja tratado por 5 min com ácido láctico 1% (2).

Em relação ao teor de ácido ascórbico, a interação entre tratamento e tempo de armazenamento foi significativa ( $p < 0,05$ ). Ao desdobrar a interação, os tratamentos controle, nanopartículas de prata e ultrassom não apresentaram alteração significativa em relação ao tempo. Apesar do tratamento ultrassom associado ao ácido láctico 1% ter apresentado falta de ajuste não significativa, seus coeficientes de regressão foram não significativos, o que indicou inadequabilidade dos modelos de regressão linear e quadrático para prever o comportamento do conteúdo de ácido ascórbico em relação ao tempo. Para os demais tratamentos foram ajustadas

equações de regressão.

O comportamento dos valores de ácido ascórbico e as equações ajustadas aos dados experimentais podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4– Modelos de equação de regressão para o teor de ácido ascórbico em tomates cereja submetidos a diferentes tratamentos de sanitização armazenados em função do tempo de armazenamento (x) e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p).

Tratamento	Modelo de Regressão	$R^2$	Prob > F
Sem sanitizar	$\bar{Y} = 16,80$	-	-
DCS 200 mg·L <sup>-1</sup>	0,3674 x + 12,8796	0,42	0,0191
DET	0,8653x + 12,2803	0,81	0,0024
AL 1%	0,5169 x + 14,2298	0,88	0,0017
NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	$\bar{Y} = 15,18$	-	-
US 40 kHz	$\bar{Y} = 15,84$	-	-
US 40 kHz + DET	0,4562x + 12,6830	0,46	0,0155
US 40 kHz + AL 1%	$\bar{Y} = 21,54$	-	-
US 40 kHz + NP 6 mg·L <sup>-1</sup>	0,4955 x + 12,9953	0,75	0,0031

Y= mg de ácido ascórbico/100 g de tomate cereja

Apesar da vitamina C ser a menos estável de todas as vitaminas e facilmente destruída durante o processamento e armazenamento, no presente estudo foi observada a manutenção e aumento do conteúdo de ácido ascórbico em alguns tratamentos de sanitização. Segundo Cruz *et al.* (2008), a taxa de destruição é aumentada pela ação de metais, especialmente de cobre e de ferro, enzimas, disponibilidade de oxigênio, o aquecimento prolongado na presença de oxigênio e a exposição à luz.

Durante a cavitação, radicais livres podem ser produzidos e estes compostos podem reagir com os alimentos, mas a interação pode ser benéfica ou não, dependendo do processo e da matriz alimentar (SORIA e VILLAMIEL, 2010). Rawson *et al.* (2011) estudaram o efeito do ultrassom em discos de cenoura e observaram retenção do conteúdo de vitamina C. Resultado semelhante ao observado no presente estudo, pois foi observada a manutenção do conteúdo de ácido ascórbico

para amostras sem sanitizar, tratadas com ultrassom 40 kHz e nanopartículas de prata  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ao longo do período de armazenamento. Para os demais tratamentos foi observado aumento do teor de ácido ascórbico e este incremento pode estar relacionado ao amadurecimento do fruto durante o armazenamento. Yahia *et al.* (2001), afirmaram que o conteúdo de ácido ascórbico é submetido a reações de oxidação e redução durante o amadurecimento do tomate. Os produtos de oxidação são radicais livres do ácido que podem ser transformados novamente ao ácido ascórbico, o que torna possível o aumento dessa substância ao longo do amadurecimento do fruto.

Ercan e Soysal (2011) observaram que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no teor de ácido ascórbico do extrato de tomate após o tratamento com ultrassom. Cao *et al.* (2010) observaram que maior conteúdo de vitamina C em morangos tratados com ultrassom 40 e 59 kHz em comparação ao controle. Resultados semelhantes foram observados em suco de morango e suco de laranja (TIWARI *et al.*, 2009a; TIWARI *et al.*, 2009b).

## 5. CONCLUSÕES

As análises microbiológicas indicaram que os tratamentos com AL 1 %, NP 6 mg·L<sup>-1</sup> e estes tratamentos em associação ao US apresentaram maiores reduções dos micro-organismos avaliados.

Não houve diferença significativa entre tratamento e interação entre tratamento e tempo para valores de pH, ATT, STT, parâmetros de cor, firmeza, conteúdo de licopeno e betacaroteno ao longo do período de armazenamento a 7 °C. O conteúdo de ácido ascórbico variou entre os tratamentos aplicados e ao longo do armazenamento e apresentou aumento para os tratamentos com DCS, DET, AL, US+DET e US+NP.

Estes resultados indicam que AL 1 %, NP 6 mg·L<sup>-1</sup> e estes tratamentos em associação ao US têm potencial para uso na sanitização de tomates cereja

## 6. REFERÊNCIAS

ABHORTICULTURA. **Tomate Cereja - Sabor e rentabilidade no mesmo produto.** Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?id=4864>>. Acesso em: 10 de junho de 2011.

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, 2010.

AKBAS, M.Y.; ÖLMEZ, H. Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut iceberg lettuce. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, n14. p. 2609–2616, 2007.

ALEXANDRE, E.M.C.; BRANDÃO, T.R.S.; SILVA, C.L.M. Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. **Journal of Food Engineering**, v.108, n.3, p.417-426, 2012.

ANESE, M.; MIROLO, G.; BERALDO, P.; LIPPE, G. Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. **Food Chemistry**, v.136, n.2, p.458-463, 2013.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of Analysis**. Washington DC, 2005.

BALIBREA, M.E.; MARTINEZ-ANDUJAR, C.; CUARTERO, J.; BOLARIN, M.C.; PEREZ-ALFOCEA, F. The high fruit soluble sugar content in wild *Lycopersicon* species and their hybrids with cultivars depends on sucrose import

during ripening rather than on sucrose metabolism. **Functional Plant Biology**, v.33, n.3, p.279–288, 2006.

BECKLES, D.M.; HONG, N.; STAMOVA, L.; LUENGWILAI, K. Biochemical factors contributing to tomato fruit sugar content: a review. **Fruits**, v.67, n.1, p. 49-64, 2012.

BEERLI, K. M. C.; VILAS BOAS, E. V. de B.; PICCOLI, R. H. Influência De Sanificantes nas características microbiológicas, físicas e físico-químicas de cebola (*Allium Cepa* L.) minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n.1, p. 107-112, 2004.

BERBARI, S.A.G.; PASCHOALINO, J.E.; SILVEIRA, N.F.A. Effect of chlorine in the washing water for disinfection of minimally processed lettuce. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p. 197–201, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2001. Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. Sec. 1: 45–53.

BRUNO, L.M.; QUEIRÓZ, A.A.M.; ANDRADE, A.P.C.; VASCONCELOS, N.M.; BORGES M.F. **Microbiological evaluation of vegetables and fruits minimally processed marketed in Fortaleza (CE)**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v.23, n.1, p. 75–84, 2005.

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.

CAMPOS, F. M.; RIBEIRO, S. M. R.; DELLA LUCIA, C. M.; STRINGHETA, P. C.; PINHEIRO-SANT’ANA, H. M. Optimization of methodology to analyze ascorbic acid and dehydroascorbic acid in vegetables. **Química Nova**, v.32, n.1, p.87-91, 2009.

CHITARRA MIF; CHITARRA AB. 2005. Póscolheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: UFLA.

CRUZ, R.M.S.; VIERIA, M.C.; SILVA, C.L.M. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. **Innovative Food Science Emergent Technology**, v.9, p. 483–488, 2008.

DEMIRAY, E.; TULEK, Y.; YILMAZ, Y. Degradation kinetics of lycopene,  $\beta$ -carotene and ascorbic acid in tomatoes during hot air drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n.1, p.172-176, 2013.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.Ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

ERCAN, S.S.; SOYSAL, C. Effect of ultrasound and temperatura on tomato peroxidase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n.2, p.689-695, 2011.

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

GOPAL, A.; COVENTRY, J.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; AJLOUNI, S. Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. **Food Microbiology**, v.27, n.2, p.210-219, 2010.

HUANG, Y.; CHEN, H. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 on baby spinach. **Food Control**, v.22, n.8, p.1178-1183, 2011.

ILAHY, R., HDIDER, CH, LENUCCI, M. S., TLILI, I., & DALESSANDRO, G. Phytochemical composition and antioxidant activity of high-lycopene tomato

(*Solanum lycopersicum* L.) cultivars grown in Southern Italy. **Scientia Horticulturae**, v.127, p.255-261, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químico-físicos para análise de alimentos**. Imprensa Oficial Do Estado. São Paulo. 2004.

JAVANMARDI, J.; KUBOTA, C. Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.41, 151–155, 2006.

KOTÍKOVÁ, Z.; LACHMAN, J.; HEJTMÁNKOVÁ, A.; HEJTMÁNKOVÁ, K. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.1703-1710, 2011.

LIANFU, Z.; ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/ microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p.731–737, 2008.

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.

PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; STRINGHETA, P.C.; BRANDÃO, S.C.C.; AZEREDO, R.M.C. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, v.61, n.1-2, p.145-151, 1998.

PINHO, L.; ALMEIDA, A.C.; COSTA, C.A.; PAES, M.C.D.; GLÓRIA, M.B.A.; SOUZA, R.M. Nutritional properties of cherry tomatoes harvested at different times and grown in an organic cropping. **Horticultura Brasileira**, v.29, p.205-211, 2011.

PORRINI, M.; RISO, P.; BRUSAMOLINI, A.; BERTI, C.; GUARNIERI, S.; VISIOLI, F.. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma

and lymphocyte concentration and improves cellular antioxidant protection. **British Journal of Nutrition**, v.93, p. 93–99, 2005.

RAWSON, A.; TIWARI, B.K.; TUOHY, M.G.; O'DONNELL, C.P.; BRUNTON, N. Effect of ultrasound and blanching pretreatments on polyacetylene and carotenoid content of hot air and freeze dried carrots discs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18 n.5, p.1172-1179, 2011.

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.

RODRIGUEZ, D. B.; RAYMUNDO, L. C.; LEE, T.; SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annual Botanic**, v.40, n.1, p.615-624, 1976.

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.

SASS-KISS, A., KISS, J., MILOTAY, P., KEREK, M. M., & TOTH-MARKUS, M. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. **Food Research International**, v.38, p.1023-1029, 2005.

SINGH, P.; GOYAL, C.K. Dietary lycopene: Its properties and anticancerogenic effects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.7, p. 255–270, 2008.

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.

SUAREZ, M.H., RODRIGUEZ, E.M.R., ROMERO, C.D. Chemical composition of tomato (*Lycopersicon esculentum*) from Tenerife, the Canary Islands. **Food Chemistry**, v.106, p.1046–1056, 2008.

SUSANA-RIVERA, C.; VENTURINI, M.E.; ORIA, R.; BLANCO, D. Selection of a decontamination treatment for fresh *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* truffles packaged in modified atmospheres. **Food Control**, v.22, n.3–4, p. 626–632, 2011.

TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P.J. Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. **European Food Research Technology**, v.228, p.717–724, 2009a.

TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; CULLEN, P.J. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurized juice. **LWT- Food Science and Technology**, v.42, p.700–704, 2009b.

TIWARI, B.K.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P.J.; O'DONNELL, C.P. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n.3, p.598-604, 2010.

TOURNAS, V.H. Molds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, n.1, p.71-77, 2005.

VELÁZQUEZ, L.C.; BARBINI, N.B.; ESCUDERO, M.E.; ESTRADA, C.L.; GUZMÁN, A.M.S. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. **Food Control**, v.20, 262–268, 2009.

YAHIA, E.M.; CONTERAS-PADILLA, M.; GONZALEZ-AGUIAR, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. **Lebensm.-Wiss und Technology**, v.34, p. 452-457, 2001.

YANG, Z.; CAO, S.; CAI, Y.; ZHENG, Y. Combination of salicylic acid and ultrasound to control postharvest blue mould caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, n.3, p.310–314, 2011.

## APÊNDICES – CAPÍTULO 2

**Apêndice A** - Análise de variância da tensão interfacial ( $\text{mJ/m}^2$ ) dos sanitizantes utilizados no experimento com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

FV	GL	SQ	QM	Prob > F
Tratamento	4	13984,3197	3496,0799	<0,001*
Erro	40	76,4424	1,9110	
Total	44	14060,7621		

**Coefficiente de variação** = 2,60

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Apêndice B** - Análise de variância do valor de pH dos sanitizantes utilizados no experimento com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

FV	GL	SQ	QM	Prob > F
Tratamento	4	272,4834	68,1208	<0,001*
Erro	40	0,1323	0,0033	
Total	44	272,6157		

Coefficiente de variação = 0,8634

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

**Apêndice C** - Análise de variância da contagem em log UFC·g<sup>-1</sup> dos tratamentos de sanitização durante 5 minutos na redução da população de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 em tomates cereja, com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Tratamento	8	21,0230	2,6278	<0,001*
Erro	26	13,8157	0,3837	
Total	44	34,8387		

Coeficiente de variação = 12,5141

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Apêndice D** - Análise de variância da contagem em log UFC·g<sup>-1</sup> de *S. enterica* Enteritidis recuperadas das soluções sanitizantes após os tratamentos por 5 min a 7 °C, com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Tratamento	3	8,1132	2,7044	0,0024*
Erro	16	5,7985	0,3624	
Total	19	13,9117		

Coeficiente de variação = 11,1070

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

**Apêndice E** - Análise de variância do diâmetro médio das nanopartículas de prata medidos por espalhamento dinâmico de luz, com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Tratamento	1	104973,3980	104973,3980	0,0014*
Erro	15	102879,683	6858,6456	
Total	16	207853,0816		

Coeficiente

de variação = 30,7279

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

### APÊNDICES - CAPÍTULO 3

**Apêndice A** - Análise de variância para redução de mesófilos aeróbios em tomates cereja submetidos após os diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Tratamento	8	37,5280	4,6910	0,001*
Erro	18	14,7386	0,8188	
Total	26	52,2666		

Coefficiente de variação = 18,0408

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Apêndice B** - Análise de variância para redução de fungos filamentosos e leveduras em tomates cereja submetidos após os diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Tratamento	8	22,5580	2,8197	0,0467*
Erro	18	29,9499	1,6638	
Total	26	52,5080		

Coefficiente  
de variação = 25,5462

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Apêndice C** - Análise de variância para redução de coliformes a 35 °C em tomates cereja submetidos após os diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Tratamento	8	12,7793	1,5974	0,0474*
Erro	17	10,4985	0,6175	
Total	25	23,2779		

Coefficiente

de variação = 21,0725

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

**Apêndice D** - Análise de variância para redução de bactérias lácticas em tomates cereja submetidos após os diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Tratamento	8	28,2682	3,5335	0,0164*
Erro	18	19,1524	1,0640	
Total	26	47,4207		

Coefficiente

de variação = 30,9387

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

**Apêndice E** - Análise de variância para redução de psicrotróficos aeróbios em tomates cereja submetidos após os diferentes de tratamentos de sanitização com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e valor de F.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamento	8	26,3693	3,2961	2,02*
Erro	18	29,3485	1,6304	
Total	26	55,7178		

Coefficiente  
de variação =

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Apêndice F** - Análise de variância para pH, acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis totais (SST) e SST/ATT e firmeza com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>Variável</b>	<b>Fonte Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
<b>pH</b>	Sanitizantes	8	0,0099	1,0000
	Resíduo (a)	9	0,2848	
	Tempo	5	0,0181	0,2232
	Tratamento*tempo	40	0,0080	0,9177
	Resíduo (b)	45	0,0124	
<b>ATT</b>	Sanitizantes	8	0,0402	0,9259
	Resíduo (a)	9	0,0689	
	Tempo	5	0,5282	0,0008
	Tratamento*tempo	40	0,0155	1,0000
	Resíduo (b)	45	0,0528	
<b>SST</b>	Sanitizantes	8	0,6073	0,9462
	Resíduo (a)	9	0,5404	
	Tempo	5	5,8124	0,0121
	Tratamento*tempo	40	0,5998	0,9998
	Resíduo (b)	45	1,4229	
<b>Razão SST/ATT</b>	Sanitizantes	8	22,9249	0,0967
	Resíduo (a)	9	60,9447	
	Tempo	5	183,2061	< 0,0001
	Tratamento*tempo	40	11,6450	0,6108
	Resíduo (b)	45	20,9629	
<b>Firmeza</b>	Sanitizantes	8	0,5056	0,5190
	Resíduo (a)	9	1,2533	
	Tempo	5	0,2529	0,8093
	Tratamento*tempo	40	0,1367	1,0000
	Resíduo (b)	45	0,2031	

Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer\*

**Apêndice G** - Análise de variância para os parâmetros de cor L\* a\* b\*, °Hue e Croma em tomate cereja submetido a diferentes tratamentos de sanitização e armazenados por 10 d a 7 °C com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>Variável</b>	<b>Fonte Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
<b>L</b>	Sanitizantes	8	0,2841	0,9888
	Resíduo (a)	9	0,6384	
	Tempo	5	0,7750	0,7309
	Tratamento*tempo	40	0,6407	0,9940
	Resíduo (b)	45	0,7046	
<b>a</b>	Sanitizantes	8	7,5266	0,8424
	Resíduo (a)	9	26,9469	
	Tempo	5	8,4084	0,7214
	Tratamento*tempo	40	10,1559	0,8888
	Resíduo (b)	45	8,1163	
<b>b</b>	Sanitizantes	8	3,9946	0,3763
	Resíduo (a)	9	4,7908	
	Tempo	5	7,2234	0,0944
	Tratamento*tempo	40	4,9428	0,1430
	Resíduo (b)	45	4,5385	
<b>Hue</b>	Sanitizantes	8	6,4554	0,9884
	Resíduo (a)	9	38,4247	
	Tempo	5	26,2207	0,5257
	Tratamento*tempo	40	18,3074	0,9593
	Resíduo (b)	45	16,9998	
<b>Croma</b>	Sanitizantes	8	9,2597	0,3566
	Resíduo (a)	9	20,3123	
	Tempo	5	5,4426	0,6508
	Tratamento*tempo	40	8,3492	0,4652
	Resíduo (b)	45	6,6838	

Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer\*

**Apêndice H** - Análise de variância para conteúdo de beta caroteno, licopeno e ácido ascórbico em tomate cereja submetido a diferentes tratamentos de sanitização e armazenados por 10 d a 7 °C com as fontes de variação (FV), respectivos graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrados médios (QM) e Prob > F.

<b>Variável</b>	<b>Fonte Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Prob &gt; F</b>
<b>Betacaroteno</b>	Sanitizantes	8	1328,7385	0,9982
	Resíduo (a)	9	3721,4123	
	Tempo	5	8796,6612	0,5546
	Tratamento*tempo	40	9420,2129	0,6931
	Resíduo (b)	45	7651,0885	
<b>Licopeno</b>	Sanitizantes	8	56742,7500	0,0771
	Resíduo (a)	9	49120,8680	
	Tempo	5	40573,0860	0,4472
	Tratamento*tempo	40	46862,2630	0,3559
	Resíduo (b)	45	41886,9480	
<b>Ácido Ascórbico</b>	Sanitizantes	8	11,5036	0,9988
	Resíduo (a)	9	6,9167	
	Tempo	5	22,7176	0,0003
	Tratamento*tempo	40	11,3580	0,0003
	Resíduo (b)	45	3,8430	

Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer\*