

EVELYN ROSSE MARY ARNEZ ZERDAS

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE COMPOSTOS QUATERNÁRIO DE AMÔNIO NA
SANITIZAÇÃO DE TOMATE, MAÇÃ E RÚCULA

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
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A748a Arnez Zerdas, Evelyn Rosse Mary, 1965-
2016 Avaliação da eficiência de compostos quaternário de
amônio na sanitização de tomate, maçã e rúcula / Evelyn
Rosse Mary Arnez Zerdas. - Viçosa, MG, 2016.
xii. 112f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Nélio José de Andrade.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Agentes ativos de
superfície. 3. *Salmonella*. 4. Amônio quaternário.
5. Desinfecção e desinfetantes . 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

EVELYN ROSSE MARY ARNEZ ZERDAS

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE COMPOSTOS QUATERNÁRIO DE AMÔNIO NA
SANITIZAÇÃO DE TOMATE, MAÇÃ E RÚCULA

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: 30 de março de 2016

Prof. Afonso Mota Ramos
Coorientador

Prof. Wilmer Edgard Luera Peña
Coorientador

Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof^a. Érica Nascif Rufino Vieira

Prof. Nélcio José de Andrade
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal CAPES e ao Departamento de Tecnologia de alimentos, pela bolsa de estudo.

Ao professor Nélcio José de Andrade pela oportunidade, pelos ensinamentos, a orientação na construção do conhecimento e pela paciência.

Aos meus Coorientadores, Afonso Mota Ramos e Wilmer E. Luera Peña, pela contribuição e apoio, na realização da presente pesquisa.

À professora Érica Nascif Rufino Vieira pela contribuição nesta pesquisa.

À Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pela contribuição na presente pesquisa.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos.

Ao professor Rolf Pushmann do Departamento de Biologia Vegetal pela colaboração nesta pesquisa disponibilizando a utilização da unidade de processamento mínimo.

Ao professor Olinto Liparini do Departamento de Fitopatologia por ceder gentilmente as estirpes de fungos utilizadas nesta pesquisa.

Às estagiárias do laboratório, Viviane Fialho, Eliara Hudson, Nayara Matiko, que colaboraram em diferentes etapas desta pesquisa.

Aos colegas do laboratório Hyasmine, Jackline, Roberta, Patrícia, João e Paola, pelos momentos compartilhados no laboratório.

Às colegas do laboratório 203, Mayara e Elizabeth e toda a equipe, pela colaboração prestada durante a utilização dos equipamentos.

À professora Edimar por facilitar o uso do espectrofotômetro.

Ao Éber Medeiros do laboratório de Embalagem por facilitar a utilização do Instron e do colorímetro.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

A meu pai Raúl Arnez pelo apoio recebido.

A meus queridos irmãos Nelson, Ruth, Valentina, Paola, Carla pelas palavras de ânimo e de maneira muito especial a minha irmã Patrícia pelo carinho e apoio.

A meu querido tio Jorge Zerdas, pelo exemplo.

Aos amigos de sempre em Viçosa, Antônio e Graça Mendes.

AGRADEÇO

A minha mãe Maria Cruz,

Ao meu esposo Milton

Aos meus amados filhos Andrés e Pablo,

Pelo carinho, compreensão e apoio irrestrito.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	X
CAPITULO 1.	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.2. Considerações gerais sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. aureus</i>	4
2.2. Considerações gerais de fungos filamentosos <i>Penicillium</i> spp e <i>Botrytis cinerea</i>	8
2.2.1. <i>Penicillium</i>	8
2.2.2. <i>Botrytis</i>	9
2.3. Adesão bacteriana	10
2.4. <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Staphylococcus aureus</i> contaminação de tomate, maçã e rúcula	12
2.4.1. Tomate	12
2.4.2. Maçã	14
2.4.3. Rúcula	15
2.5. Compostos amônio quaternário de amônio	16
2.5.1. Atividade bactericida e fungicida dos compostos de quaternário de amônio	18
2.5.2. Mecanismos de atividade bactericida	19
2.5.3. Mecanismo de atividade fungicida	21
2.6. Sanitização de frutas e hortaliças	22
2.7. Controle microbiano em superfícies vegetais com compostos de quaternário de amônio	24
3. REFERÊNCIAS	26
CAPITULO 2.	34
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS COMPOSTOS DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIO, <i>IN VITRO</i> PARA <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS; <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E OS FUNGOS FILAMENTOSOS <i>PENICILLIUM EXPANSUM</i> , <i>PENICILLIUM DIGITATUM</i> E <i>BOTRYTIS CINEREA</i> . 34	
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.2. Tensoativos de quaternário de amônio	37
2.3. Micro-organismos	38
2.4. Difusão em meio sólido para bactérias	38

2.4.1.	Preparação do inóculo das bactérias.....	38
2.5.	Método de difusão em meio sólido para fungos.	39
2.6.	Método de macrodiluição em tubos, determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	
	40	
3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.	RESULTADOS	41
4.1.	Determinação da atividade antimicrobiana dos tensoativos de amônio quaternário	41
4.2.	Ação bactericida pelo teste de macrodiluição	44
4.3.	Comparação entre os testes de difusão em meio sólido e macrodiluição	45
4.4.	Ação fungicida pelo método de difusão em meio sólido.....	46
5.	CONCLUSÕES.....	49
CAPITULO 3.		52
ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA ADESÃO BACTERIANA E SANITIZAÇÃO DE VEGETAIS COM TENSOATIVOS CATIÔNICOS.....		
		52
1.	INTRODUÇÃO	54
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1.	Superfícies vegetais	55
2.2.	Preparo das soluções sanitizantes	56
2.3.	Condicionamento das superfícies com tensoativos.....	56
2.4.	Preparo dos micro-organismos.....	56
2.5.	Determinação do ângulo de contato dos micro-organismos; dos tensoativos e das superfícies vegetais condicionadas com tensoativos ou não.....	57
2.5.1.	Tensoativos.....	57
2.5.2.	Micro-organismos	57
2.5.3.	Superfícies vegetais	58
2.6.	Adesão de micro-organismos em superfícies vegetais condicionadas com tensoativos.....	60
2.7.	Sanitização das superfícies de maçã, tomate, e rúcula contaminadas com <i>S. Enteritidis</i> e com <i>S. aureus</i>	61
3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.2.	Adesão bacteriana nas superfícies de tomate, e rúcula pré-tratadas com tensoativos 73	
4.3.	Sanitização das superfícies vegetais com diferentes agentes tensoativos	78
5.	CONCLUSÕES.....	80
6.	REFERENCIAS.....	81
CAPÍTULO 4.		86

SANITIZAÇÃO DE TOMATE COM CLORETO DE BENZALCÔNIO: EFEITO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOTA DO TOMATE CV. ITALIANO	86
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.2. Amostra Vegetal	90
2.2. Tratamentos com sanitizantes	91
2.3 . ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	91
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	94
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
4.1. Acidez Total Titulável	95
4.2. Sólidos solúveis totais (°Brix)	97
4.3. Ratio (Brix / Acidez).....	99
4.4. Cor instrumental	100
4.5. Firmeza.....	106
4.6. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS TOMATES	107
5. CONCLUSÃO	110
6. REFERÊNCIAS	111

RESUMO

ARNEZ ZERDAS, Evelyn Rosse Mary, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Avaliação da eficiência de compostos quaternário de amônio na sanitização de tomate, maçã, e rúcula.** Orientador: Nélío José de Andrade. Coorientadores: Afonso Mota Ramos e Wilmer Edgard Luera Peña.

Compostos de quaternário de amônio possuem propriedades tensoativas, bactericida e fungicida, que podem atuar sinergicamente no processo de sanitização. Objetivou-se avaliar o efeito antibacteriano e antifúngico de cinco compostos quaternário de amônio sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis in vitro* e em superfícies vegetais, e de fungos filamentosos *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea in vitro*. Especificamente, os compostos quaternários de amônio foram avaliados na sua capacidade de a) alterar as propriedades termodinâmicas da superfície de frutos de tomate e maçã e de folhas de rúcula, e da adesão de *S. Enteritidis* e *S. aureus*, b) atuar como sanitizante de bacterianas aderidas nas superfícies de frutos de tomate e folhas de rúcula, e, c) influenciar nas propriedades físico-químicas e qualidade microbiológica de frutos de tomate sanitizados, durante a vida de prateleira. O efeito bactericida e fungicida *in vitro* de soluções de quaternário de amônio cloreto de alquilbenzil dimetilamônio (BAC), cloreto de metil trialquil amônio (CMTA), cloreto benzil dimetil amônio (CBDMA), metil dodecil benzil trimetil cloreto de amônio (CMBTA) e de um formulado comercial contendo (BAC+etilbenzalcônio) foram avaliadas por macrodiluição e difusão em meio sólido, determinando as suas concentrações inibitorias mínimas (CIMs). A alteração das propriedades termodinâmicas das superfícies vegetais pré-tratadas com as concentrações predeterminadas de BAC e de BAC+ETB no teste *in vitro*, foi realizado pelo método do ângulo de contato e o uso das equações da termodinâmica de Young e Laplace. As mudanças na adesão de *S. Enteritidis* e *S. aureus* nas superfícies de tomate, maçã e rúcula foram quantificadas por contagem em placa, e os resultados expressados em Log de UFC/cm². A capacidade sanitizante foi avaliada após adesão bacteriana em

tomate e rúcula por imersão em soluções de BAC e BAC+ETB. As células sobreviventes foram recuperadas e quantificadas por contagem em placa, e os resultados expressos em reduções decimais (RD). A avaliação da alteração das propriedades físico-químicas, cor, sólidos solúveis totais, acidez titulável, firmeza de frutos de tomate foram realizados a cada três dias após sanitização com soluções de BAC, detergente comercial (DET), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), e água como controle. A qualidade microbiológica foi avaliada no dia 0 e 21 do período de conservação. Os frutos foram conservados em bandejas de isopor cobertas com filme PVC a 7°C. Os resultados do teste *in vitro* verificou a capacidade bactericida dos cinco quaternários de amônio, em determinadas concentrações cada. BAC e BAC+ETB apresentaram também atividade fungicida em todas nas 10 diluições avaliadas. As concentrações inibitórias mínimas CIMs foram determinadas para ambas, *S. aureus* e *S. Enteritidis* em 0,03 mg/mL para BAC e 3,12 mg/mL para BAC+ETB. Os amônios quaternários com maior atividade antifúngica, para *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*, foram BAC, na concentração de 4 mg/L, e o BAC+ETB, na concentração de 100 mg/mL. As superfícies de tomate, maçã e rúcula naturalmente hidrofóbicas mudaram para hidrofílicas quando pré-tratadas com BAC e de BAC+ETB tornando as superfícies termodinamicamente desfavoráveis para a adesão ($\Delta G_{adesão} > 0$) de *S. aureus* e *S. Enteritidis*. O pré-tratamento de tomate e rúcula com 125 mg/L de BAC resultou, respectivamente, em contagens de 5,2 log UFC/cm² e 5,1 log UFC/cm² de *S. aureus*. Já, o pré-tratamento com 6250 mg/L de BAC+ETB resultou em 0,16 log UFC/cm² para tomate e 0,05 log UFC/cm² para rúcula. As contagens de *S. Enteritidis* nas superfícies de tomate e rúcula pré-tratadas com 125 mg/L de BAC foram 5,0 e 7,8 log UFC/cm², respectivamente. Estas mesmas superfícies pré-tratadas com 6250 mg/L de BAC+ETB, tiveram contagens de *S. Enteritidis* de 3,55 log UFC/cm² sobre tomate e 3,8 log UFC/cm² para rúcula. Os mesmos compostos aplicados como sanitizantes sobre as superfícies vegetais previamente contaminadas atingiram reduções decimais (RD) de 4,8; 6,1; 5,6 para: *S. Enteritidis* na superfície de maçã, tomate, e rúcula, respectivamente. A sanitização com 6250 mg/L de BAC +ETB, para *S. aureus* apresentaram 3,6 RD para maçã e 1,0 RD para tomate. A sanitização com 125 mg/L de BAC resultou reduções para *S. aureus* de 1,4 RD em maçã,

2,8RD em tomate e 2,4RD em rúcula. Com relação às características físico-químicas, observou-se que a acidez titulável (ATT) foi diminuída ($P < 0,05$) por DET e DCICNA ao longo do período de conservação, com relação aos frutos tratados com água. A relação Brix/ATT não apresentou diferenças entre os tratamentos. A relação a^*/b^* da escala de cor de Hunter aumentou até o final do período de conservação, e verificando-se a intensificação da cor vermelha em frutos tratados com BAC. Não houve influência na mudança da cor dos outros tratamentos. A firmeza no dia 21 de armazenamento foi diminuída em 57 % e 61 % pelos tratamentos DCICNA e DET, respectivamente, com relação ao valor do dia zero. BAC reduziu em 46% a firmeza dos frutos, valor semelhante ao controle. A sanitização dos frutos com BAC, DET e DCICNA, no dia zero, reduziu, respectivamente, em 1,9 RD, 0,9 RD e 1,8 RD a população de mesófilos aeróbios e 1,1 RD, 0,4 RD e 0,9 RD a população de fungos filamentosos e leveduras. A persistência da ação dos quaternários de amônio ficou semelhante à do controle (água) no final do período de conservação, verificando-se a sua falta de persistência. Conclui-se que soluções de BAC e de BAC+ETB são alternativas ao uso dos compostos clorados como a DCICNA por reduzir a população bacteriana e desfavorecer a adesão bacteriana, sem alteração das propriedades físico-químicas dos vegetais.

ABSTRACT

ARNEZ ZERDAS, Evelyn Rosse Mary, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2016. **Evaluation of the efficiency of quaternary ammonium compounds in sanitization of tomato, apple and rocket.** Adviser: Nélío José de Andrade. Co-Advisers: Afonso Mota Ramos and Wilmer Edgard Luera Peña.

Quaternary ammonium compounds have surfactant properties, bactericide and fungicide, which may act synergistically in the sanitization process. This study aimed to evaluate the antibacterial and antifungal effect *in vitro* of five quaternary ammonium compounds on the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis *in vitro* and vegetables surfaces, and filamentous fungi *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* *in vitro*. Specifically, quaternary ammonium compounds were evaluated on their ability to a) change the thermodynamic properties of the tomato and apple fruit surfaces and rocket leaves, and *S. Enteritidis* and *S. aureus* adhesion, b) act as sanitizing of bacteria attached on the surfaces of fruits of tomato and rocket leaves, and, c) influence on the physicochemical properties and microbiological quality of fruits of tomato sanitized, during shelf life. The bactericidal and fungicidal *in vitro* quaternary solutions of ammonium chloride alquilbenzil dimethyl (BAC), methyl trialkyl ammonium chloride (CMTA) benzyl dimethyl ammonium (CBDMA) chloride, methyl dodecyl benzyl trimethyl ammonium chloride (CMBTA) and a commercial formulated containing (BAC+etilbenzalcônio) were evaluated by determining the minimum inhibitory concentrations (MICs) for macrodilution and broadcast on solid medium. The alteration of the thermodynamic properties of the pretreated vegetable surfaces, with concentrations of BAC and BAC + ETB predetermined *in vitro* assay was conducted by the contact angle method and the use of thermodynamic equations of Laplace and Young. Changes in the adhesion of *S. Enteritidis* and *S. aureus* on surfaces of tomato, apple and rocket were quantified by counting in a plate and the results expressed in Log CFU/cm². The sanitizing capability was evaluated after bacterial adhesion in tomato and rocket dip in BAC solutions and BAC + ETB. The surviving cells were recovered and quantified by

counting in a plate and the results expressed as decimal reduction (DR). Assessment of the alterations in physico-chemical properties, color, soluble solids, titratable acidity, firmness of tomato fruits were performed every three days after sanitization with BAC solutions, commercial detergent (DET), sodium dichloroisocyanurate (DCICNA) and water as control. The microbiological quality was evaluated on day 0 and 21 of the conservation period. The fruits were stored in covered Styrofoam trays with plastic wrap to 7 °C. The in vitro assay results verified the bactericidal capacity of the five quaternary ammonium compounds at certain concentrations each. BAC and BAC + ETB also showed fungicidal activity in all the 10 evaluated dilutions. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined for both, *S. aureus* and *S. Enteritidis* at 0.03 mg/ml for BAC and 3.12 mg/ml for BAC + ETB. The quaternary ammoniums with higher antifungal activity to *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* were 4000 mg/l of BAC and BAC + ETB at concentration of 100 mg/ml. The surfaces of tomato, apple and rocket, naturally hydrophobic, changed to hydrophilic when pretreated with BAC and BAC + ETB, making thermodynamically unfavorable surfaces for adhesion ($\Delta G_{\text{ads}} > 0$) of *S. aureus* and *S. Enteritidis*. Pretreatment of tomatoes and rocket with 125 mg/L BAC resulted, respectively, in counts of 5.2 log CFU/cm² and 5.1 log CFU/cm² of *S. aureus*. Already, the pre-treatment with 6250 mg/L BAC + ETB resulted in 0.16 log CFU/cm² for tomato and 0.05 log CFU/cm² for rocket. The *S. Enteritidis* counts the surfaces of tomato and rocket pretreated with 125 mg/L BAC were 5.0 and 7.8 log CFU/cm², respectively. These same surfaces pre-treated with 6250 mg/L BAC + ETB had counts of *S. Enteritidis* of 3.55 log CFU/cm² on tomato and 3.8 log cfu/cm² for rocket. The same compounds applied as sanitizers on the previously contaminated surfaces reached decimal reductions (DR) of 4.8; 6.1; 5.6 to *S. Enteritidis* on the surface of apple, tomato, and rocket, respectively. The sanitization with 6250 mg/L BAC + ETB, *S. aureus* showed 3.6 RD and 1.0RD for apple and tomato. The sanitization with 125 mg/L BAC resulted for *S. aureus* 1.4 RD in apple, 2.8RD in tomato and 2.4RD in rocket. Regarding the physical and chemical characteristics, it was observed that the titratable acidity (TTA) was decreased ($P < 0.05$) for DET and DCICNA throughout the storage period, in relation to the fruits treated with water. The ratio Brix / TTA showed no differences between

treatments. The a^*/b^* Hunter color scale increased until the end of the storage period, and verifying the intensification of red color in fruit treated with BAC. There was no influence in changing the color of the other treatments. Firmness in day 21 of the storage period was decreased by 57% and 61% by DCICNA and DET treatments, respectively, on the day zero value. BAC reduced by 46% the fruit firmness, value similar to the control. The sanitization of fruits with BAC, DET and DCICNA on day zero, reduced respectively by 1.9 RD, RD 0.9 and 1.8 RD population of aerobic mesophilic, and 1.1 RD, RD and 0.4 RD population of filamentous fungi and yeast. The persistence of action of quaternary ammonium were similar to the control (water) at the end of the retention period, verifying their lack of persistence. We conclude that BAC solutions and ETB + BAC are alternatives to the use of chlorinated compounds such as DCICNA by reducing the bacterial population and discourage bacterial adhesion without changing the physicochemical properties of vegetables.

CAPITULO 1.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE COMPOSTOS QUATERNÁRIO DE AMÔNIO NA SANITIZAÇÃO DE TOMATE, MAÇÃ E RÚCULA

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano, mais de dois milhões de pessoas morrem por diarreias decorrentes da ingestão de alimentos elaborados, hortaliças e frutas frescas, contaminados com bactérias patogênicas (THUNBERG *et al.*, 2002; OMS, 2013, CDC 2014)

A contaminação microbiana de produtos hortifrutícolas pode ocorrer nas fases de pré-colheita, colheita e pós-colheita, e são o resultado do contato dos produtos com fontes de micro-organismos patogênicos e deterioradores, como solo, fertilizantes, água de irrigação, manipuladores, equipamentos de colheita, materiais para transporte e comercialização (BEUCHAT, 2006, SPOTO, 2014).

Frutas e hortaliças também são hospedeiros naturais de fungos e bactérias fitopatógenas de ampla ocorrência nas áreas de cultivo e podem manifestar-se durante a pós-colheita e, causar o apodrecimento e/ou a produção de micotoxinas (JOHANNESSEN *et al.*, 2002, AGRIOS, 2005).

Na prevenção do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos são utilizados soluções a base de cloro como sanitizante (RUIZ-CRUZ *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2013) e fungicidas como tiabendazol e imazalil no controle de fungos fitogênicos (FISCHER *et al.*, 2009; NICOLI, *et al.*, 2009; GEEP *et al.*, 2012; MIRA *et al.*, 2015).

Entretanto, esses compostos têm efeitos carcinogênicos no caso do cloro e de toxicidade residual no caso dos fungicidas (SKANDAMIS *et al.*, 2001). O risco químico associado à utilização de compostos clorados e fungicidas nas frutas e hortaliças constitui uma preocupação frequente de saúde pública em função dos possíveis efeitos nocivos à saúde humana.

Entre os compostos alternativos ao uso do cloro ativo, estão os compostos de quaternário amônio (CAQs) que apresentam eficiência para o controle de micro-organismos (PARISH *et al.*, 2003; PONTES *et al.*, 2012)), sendo o cloreto de benzalcônio o quaternário de amônio mais utilizado. Os CAQs apresentam efeito preventivo no controle de fungos fitopatogênicos (ABREU, 2006; CARVALHO *et al.*, 2009), entre tanto a sua eficiência antimicrobiana é definida em função da estrutura molecular, e a concentração de uso(PONTES *et al.*, 2012).

Os CAQs como grupo químico apresentam uma diversidade estrutural em função do tamanho da cadeia, número de ramificações e tipo de substituintes nas ramificações (TADROS, 2005). Essas particularidades determinam a sua funcionalidade como sanitizantes em superfícies inertes ou biologicamente ativas como as dos vegetais. Apesar dos CAQs terem sido bem caracterizadas como sanitizantes em superfícies inertes (FAZLARA *et al.*, 2012) existe necessidade de maior compreensão da interação com as superfícies vegetais e dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

A sanitização de superfícies vegetais, involucra desafios como a diversidade topográfica das superfícies, a variada composição das ceras cuticulares e o grau de cerosidade das superfícies, todas estas características devem ser consideradas para conseguir uma adequada sanitização (VELAZQUES *et al.*, 2009; LICHTER *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013).

Os CAQs pela característica tensoativa que possuem poderiam potencialmente influenciar na interação superfície da bactéria/superfície vegetal. (ATKIN *et al.*, 2003), facilitando a sanitização das superfícies vegetais, (VELAZQUES, *et al.*, 2009).

Por tanto objetivou-se avaliar compostos de amônio quaternário quanto a sua atividade antimicrobiana. E a influência de sua propriedade tensoativa na interação superfície vegetal / bactéria no processo de adesão bacteriana. Além de sua influência na qualidade físico-química e microbiológica durante a sua conservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A ocorrência de surtos associados ao consumo de frutas e hortaliças cruas, continua apesar do aprimoramento dos métodos de sanitização(CDC, 2014);

Frutas e hortaliças são contaminadas já no campo, pela adesão de bactérias que se fixam na sua superfície (SAUDERS, *et al.*, 2009) mas também podem contaminar-se durante o manuseio pós-colheita (HOELZER *et al.*,2012), mesmo depois da sanitização.

O uso de hipoclorito de sódio como sanitizante é prática comum, embora seja questionada pela sua baixa eficiencia e pela formação de trihalometanos que são nocivos à saúde (BAERT *et al.*, 2011).Nesse sentido, pesquisas devem ser realizadas afim de aprimorar seu uso, ou de encontrar alternativas ao uso do cloro mediante a substituição com outros agentes químicos eficientes e de menor risco químico para manipuladores, consumidores (OLIVEIRA, 2015).

Compostos de amônio quaternário utilizados como sanitizantes se apresentam como uma alternativa ao uso de compostos de cloro, (VELAZQUES *et al.*, 2009).

A colonização dos fungos filamentosos sobre o tecido vegetal se realiza por meio da desintegração dos componentes estruturais do vegetal como ser, a cutícula por meio da cutinase, e a parede celular através de enzimas pectinolítica (AGRIOS, 2005; GARCION *et al.*,2007; SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

A resposta do vegetal procura inibir a germinação e/ou crescimento do patógeno, mediante a síntese de fenóis, alcaloides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e β -1,3 glucanases, (REINA-PINTO e YEPHREMOV, 2009).

Nesse sentido, os sanitizantes com propriedades tensoativa poderiam interferir na relação patógeno-vegetal uma vez que os tensoativos carregados positivamente podem ocupar sítios específicos de interação, por exemplo, impedindo o reconhecimento dos estômatos pela ausência de uma estrutura

indutora do opressório do fungo favorecendo a remoção dos esporos das superfícies vegetais, e a inibição da atividade enzimática do fungo, em função com o tipo e concentração do tensoativo.

2.2. Considerações gerais sobre *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus*

Salmonella spp. e *Staphylococcus aureus* estão considerados entre os mais importantes patógenos por causarem morbidade e mortalidade mundial e serem facilmente veiculadas pelos alimentos (SCHREIBER *et al.*, 2011, ZHANG, *et al.*, 2012). Com frequência, as duas bactérias são encontrados simultaneamente em algumas matrizes de alimentos contaminados, tais como produtos de leite cru, frutas e hortaliças minimamente processadas (LECLERC *et al.*, 2002).

Os sorovares de *Salmonella* entérica e *Escherichia coli* causam o maior número de contaminações atribuídas ao consumo de frutas e hortaliças cruas (YAROM e ROMLING, 2014) como alface, espinafre, couve e rúcula. O grau de contaminação varia de um país para outro. Em Zankar na Turquia, os graus de contaminação relatados para hortaliças folhosas foram de 14 % para *Salmonella* spp. (AYTAC *et al.*, 2010) e na Zâmbia e Malásia *S. Enteritidis* foi relatada com prevalência entre 20 % e 35 % em hortaliças folhosas. Esses índices são altos comparados com os relatados, em Catalunha, na Espanha, e em São Paulo, Brasil, que foram de 0,74 % e 3 %, respectivamente, para saladas preparadas (FRODER *et al.*, 2007; BADOSA *et al.*, 2008). Contudo, pode-se esperar surtos em qualquer país, pois estes micro-organismos são inerentes à presença humana, de animais e de esterco de origem animal utilizado nos sistemas de produção, agrícola (GONÇALVES e CARVALHO, 2006)

2.1.1. *Salmonella* Enteritidis

Salmonella é um bacilo Gram negativo, sendo seu habitat o aparato gastrointestinal dos animais e do homem. Este micro-organismo geralmente associado a problemas gastrointestinais e septicêmicos (ADLEY *et al.*, 2011).

Salmonella spp. esta disseminada no ambiente e é resistente às condições adversas o que favorece a sua sobrevivência por várias semanas em locais secos e por vários meses em água (OMS, 2013).

Entre os mecanismos de sobrevivência da *Salmonella* esta a adesão na superfície do hospedeiro, para isto conta com estruturas denominadas adesinas, as que reconhecem moléculas com estereo química específica (receptores) presentes no hospedeiro (OCHOA *et al.*, 2005). Estas moléculas receptoras são as que determinam a especificidade do tecido vegetal pelas adesinas e participam na colonização eficiente do hospedeiro (GOLDMAN *et al.*, 2011).

Nas bactérias Gram negativas como a *Salmonella* as adesinas presentes são fimbria, fibrila flagelo, lipopolissacarídeos (OCHOA *et al.*, 2005). Berger *et al.* (2009), relataram que existem diferenças nas ligações dos flagelos com a superfície vegetal entre os diferentes sorovares de *S. enterica*, assim evidenciaram que diferentes sorovares de *Salmonella* utilizam mecanismos específicos de adesão com base nas características dos exopolissacarídeos produzidos e de seus flagelos, (GOLDMAN *et al.*, 2011).

Oliveira *et al.* (2007) identificaram em quatro estirpes diferentes de *S. Enteritidis* uma forte dependência entre o sorovare o grau de adesão das mesmas em superfície de aço inoxidável, e atribuíram esta diferença a fatores como a produção de exopolissacarídeos, constituindo estes um diferencial de persistência utilizado por bactérias patogênicas para sobreviver em superfícies inertes, mediante a formação de biofilmes.

Na adesão, os apêndices celulares como pili, fímbrias e flagelos, são utilizados como estruturas de fixação na superfície e a formação de agrupamentos celulares, o que lhes permite resistir às condições ambientais desfavoráveis, como os posteriores tratamentos de lavagem e sanitização (GIVSKOV e BJARNHOLT, 2010, STEENACKERS *et al.*, 2012; YAROM e ROMLING, 2014). É importante ressaltar que diversos estudos em frutas e hortaliças e sementes relatam que as bactérias não são totalmente eliminadas apesar da utilização de diversos métodos de sanitização (BEUCHAT, *et al.*,

2001). As bactérias também persistem devido à ocorrência do crescimento endofítico, protegido pelas estruturas vegetais (LANG *et al.*, 2004).

Surtos de salmonelose estão associados ao consumo de vegetais crus contaminados (BERGER *et al.*, 2010). Assim, surtos podem originar-se do consumo de sementes alfafa e soja germinada, (BEUCHAT, 2006), tomate (BARAK e LIAN, 2008, CDC, 2014); alface (BRANDL *et al.*, 2013), rabanete e cenoura (ISLAM *et al.*, 2004), o que evidencia a capacidade de *S. enterica* de colonizar diversas superfícies vegetais, incluindo sementes, brotos, folhas, frutos ou raízes, por meio de diversos mecanismos que contribuem para a adesão e formação de biofilme associada à alta persistência da *Salmonella enterica* (BARAK e SCHNEIDER, 2009)

Salmonella Newport e *S. Enteritidis* aderidas em um sistema otimizado para produção de brotos de alfafa apresentaram pontos de ligação preferencial, o que indica que determinadas estruturas vegetais possuem maior afinidade molecular (KROUPITSKI *et al.*, 2009), fator importante para a recontaminação pós-processamento (BARAK *et al.*, 2009).

2.1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um importante agente patogênico oportunista presente no nariz, pele e trato intestinal dos humanos.

A superfície de *S. aureus* apresenta muitas proteínas que são covalentemente ligadas ao peptidoglicano da parede celular bacteriana (FOSTER *et al.*, 2014) situação que favorece a sua adesão e multiplicação.

As proteínas de superfície amino-terminais têm funções na adesão e invasão de células hospedeiras e tecidos, e na formação de biofilme. Assim, essas proteínas são fatores essenciais para a sobrevivência, virulência e infecções invasivas de *S. aureus* (FOSTER *et al.*, 2014).

Algumas estirpes de *S. aureus* sintetizam proteínas extracelulares adicionais, entre as mais importantes estão as hemolisinas que têm a capacidade hemolítica e citolítica e atuam sobre as células hospedeiras, como

leucócitos e plaquetas. A hemolisina delta (δ) provoca lises de eritrócitos e membranas celulares em pessoas contaminadas fatores que agravam os efeitos do surto.

As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas por 30 % a 50 % das estirpes de *S. aureus*. Dentre elas foram descritas 15 diferentes, sendo o sorotipo A, a mais frequente. As enterotoxinas são termoestáveis e resistem às enzimas digestivas do ser humano, e podem provocar intoxicações (CERVANTES-GARCIA *et al.*, 2014).

Intoxicação estafilocócica foram associadas ao consumo de hortaliças cruas contaminadas (YOUN-HO *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2013) que veiculam bactérias patogênicas originadas na água de lavagem. O diferencial de pressão osmótica entre a água e a célula vegetal pode favorecer a invasão de *S. aureus* no interior dos frutos, como observado em tomate por Ofor *et al.* (2009) e constituir risco para a saúde do consumidor.

O manuseio repetitivo dos vendedores e compradores de rua pode ser outro fator de contaminação com bactérias enteropatogênicas, Poona *et al.* (2001) relataram a associação entre a venda na rua e a maior contaminação de hortaliças cruas, frutas e brotos de sementes, a análise de 120 amostras, os patógenos encontrados foram, *S. aureus*, *E. coli*, e *Salmonella Typhi*.

Embora que frutas e hortaliças minimamente processadas seguem um rigoroso protocolo de sanitização e conservação da cadeia de frio, podem apresentar contaminação devido à presença de cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Young-Ho *et al.* (2010), relataram que *S. aureus* multiplica nas hortaliças minimamente processadas. Em três anos de monitoramento sanitário constataram que 11,6 % de amostras continham *S. aureus*, e 7 % do total de amostras continham estirpes enterotoxigênicas ou resistentes à antibióticos.

Embora nos produtos minimamente processados sejam aplicados processos de sanitização e o mantimento da cadeia de frio, as baixas temperaturas não garantem totalmente a preservação da qualidade microbiológica, o aumento da contaminação inicial de *S. aureus* em pepinos, tomates e melões minimamente processados, mantidos a 4 °C, foi reportado por Del-Campo *et al.* (2001).

2.2. Considerações gerais de fungos filamentosos *Penicillium* spp e *Botrytis cinerea*

2.2.1. *Penicillium*

Penicillium é um colonizador agressivo tanto em solo como em plantas. Munido de diversas enzimas e com a produção de antimicrobianos consegue uma vantagem competitiva em relação à outros micro-organismos, incluindo *Botrytis cinerea*.

O corpo de frutificação de *Penicillium* sp. é parecido ao de um pincel (Figura 1a), de onde deriva o seu nome no latim. Comumente, conhecido como bolor das frutas e hortaliças, caracteriza-se por possuir pequenos e leves esporos esféricos (conidiósporos) que brotam de conídios que surgem na extremidade de uma hifa especializada, oconidióforo (Figura 1b). Durante o desenvolvimento do micélio, o fungo atravessa várias etapas que podem ser visualizadas por coloração do conjunto de micélios (Figura 1b).

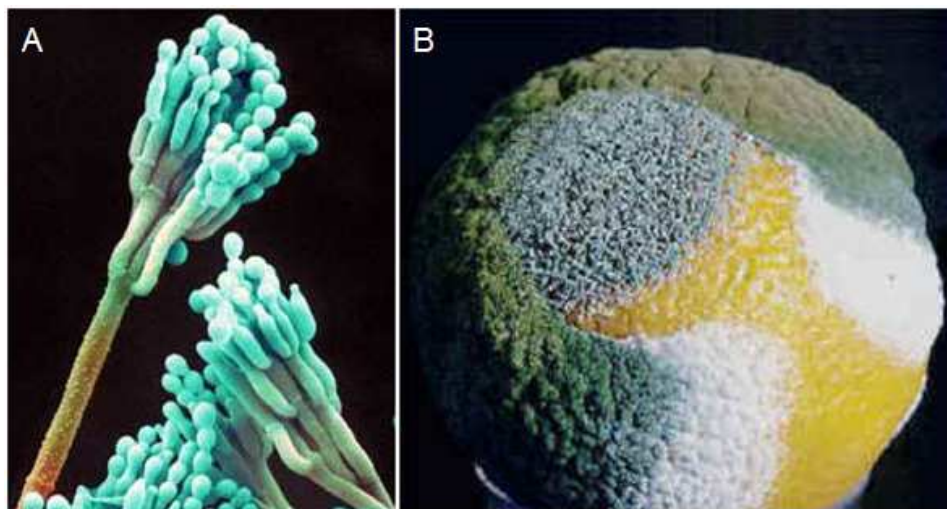


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura mostrando o corpo de frutificação do *Penicillium* sp. (A) e micélio em diferentes estádios de desenvolvimento crescendo na superfície de uma laranja (B). Fonte www.sobiologia.com.br

A forma de dispersão do fungo é por esporos denominados conídias, que são transportadas pelo ar ou pela água e caem na superfície das frutas. Dentre as conídias colonizadores, 50 % ficam inativas após 6 dias do seu contato na superfície da fruta.

As temperaturas ótimas de multiplicação do *Penicillium* spp estão na faixa de 25 °C a 35 °C, mas também podem se multiplicar à temperatura abaixo de 0 °C (BARALDI *et al.*, 2003). A faixa de pH para sua multiplicação é ampla entre 2 e 10. Em presença de umidade as hifas de *Penicillium* spp. formam massas de esporo cor branco neve que com o tempo alteram-se para cor verde.

Este fungo precisa de outros micro-organismos danifiquem a superfície das frutas, isto porque a pele cerosa de frutas como a maçã, é uma proteção natural contra a infecção por fungos, *Penicillium* multiplica-se em regiões danificadas das frutas e/ou em aberturas naturais como lenticelas e tricomas.

A atividade de água (**Aa**) para multiplicação de *Penicillium* varia entre 0,82 e 0,95, que é ótimo para o crescimento micelial, entretanto **Aa** mínima para a formação de esporos é de 0,85 (OSTRY *et al.*, 2004).

2.2.2. Botrytis

O gênero *Botrytis* é de importância mundial por afetar diversas espécies em estádios diferentes de desenvolvimento e pela difícil ou nenhuma existência de cultivares resistentes. Este fungo ataca à plantas nas fases vegetativa e reprodutiva, particularmente, flores e frutos durante a produção e o período de armazenamento (FILLINGER e ELAD, 2015)

Após a colheita, nos frutos armazenados formam-se manchas escuras na epiderme, possibilitando atingir o mesocarpo, que neste caso torna-se amarronzado e com uma consistência gelatinosa.

Botrytis cinerea produz crescimento acinzentado abundante sobre os tecidos afetados (Figura 2b), composto por hifas e conidióforos ramificados que

possuem no ápice conídios unicelulares, ovóides, incolores ou acinzentados (Figura 2a). Os conídios são liberados em condições climáticas úmidas e são transportados por correntes de ar para novos tecidos vegetais e frutos durante a fase de amadurecimento (BENITO *et al.*, 2000).

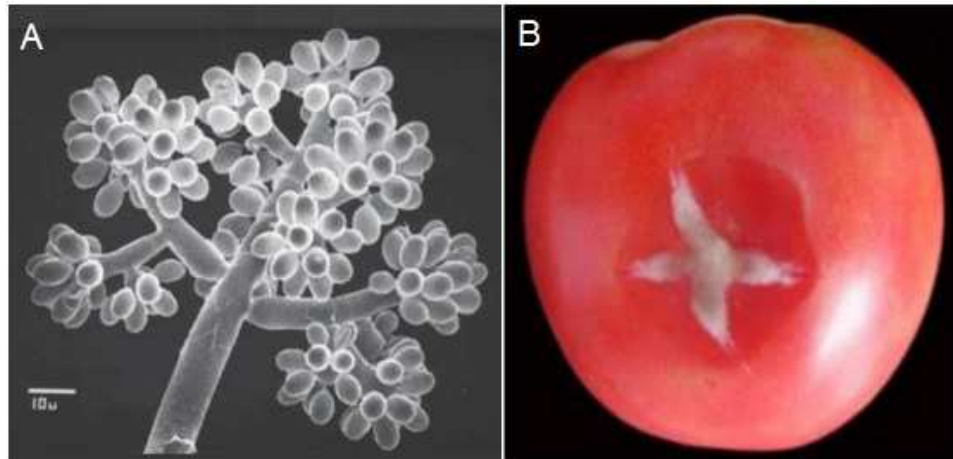


Figura 2. Microfotografia do corpo de frutificação do *Botrytis cinerea* (A) e micélio em desenvolvimento em tomate pós-inoculação (B). Fonte Zhang *et al.*, 2014.

A temperatura ideal para o desenvolvimento do míldio está entre 18 °C e 25 °C. O fungo necessita de água nos tecidos por um período mínimo de 2 h para haver infecção. A presença de água, seja proveniente de chuva, de orvalho, ou de gutação, é indispensável para haver a infecção, sendo a umidade relativa do ar acima de 98 % necessária para haver a esporulação (GARRIDO e SÔNEGO, 2003).

2.3. Adesão bacteriana

O controle da qualidade microbiológica das frutas e hortaliças é determinante em todas as etapas de produção e comercialização para oferecer ao consumidor um produto inócuo. Toda contaminação microbiológica inicia-se com a adesão das bactérias na superfície dos alimentos e sua posterior multiplicação. A adesão se inicia com o contato entre a bactéria e a superfície das frutas e hortaliças, denominada de adesão reversível, quando predominam as forças de van der Waals, que são forças fracas de longo alcance e permitem

a remoção bacteriana pela ação mecânica da água de lavagem, (REINA *et al.*, 2002; BAKKER *et al.*, 2004; ANDRADE, 2008).

A segunda etapa é denominada de adesão irreversível, quando há predomínio das forças eletrostáticas, em que a carga da bactéria é oposta à carga da superfície. E o terceiro estágio da adesão é a multiplicação das bactérias e a formação dos biofilmes (BEUCHAT, 1998; ANDRADE, 2008)

Uma forte adesão pode ser o início da formação do biofilme, o que confere às bactérias a capacidade de permanecer ligadas ao material, mesmo na existência de um importante estresse mecânico externo. Dentre os fatores que influenciam nesta adesão estão propriedades físico-químicas do material como hidrofobicidade e rugosidade (SAUNIER *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2015)

As interações das bactérias com a interface da superfície de adesão podem ser do tipo específico ou não específico. Interações específicas envolvem o reconhecimento de moléculas presentes na célula do hospedeiro chamadas receptores, com estereoquímica específica para uma adesina que se encontra na superfície do micro-organismo. Entretanto, a interação não específica é regida pelas propriedades físico-químicas das duas interfaces interatuantes, isto é superfícies do micro-organismo e com a superfície de adesão (ABBASNEZHAD *et al.*, 2008)

Apenas as interações interfaciais são relevantes para a definição de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, a diferença básica entre essas interações é a competição entre a energia livre interfacial de coesão do sólido imerso na água, e a energia livre de coesão do líquido (van OSS e GIESE, 1995).

Entre as propriedades físico-químicas de superfície das bactérias, a hidrofobicidade das mesmas é considerada relevante no estudo da adesão não específica da bactéria em uma superfície. A hidrofobicidade de uma superfície reflete inúmeras interações moleculares como ligações covalentes, de ponte de hidrogênio e as forças de dispersão que ocorrem entre a interface bacteriana e a interface da superfície, sendo todas estas formas de interação, importantes no processo de adsorção e posterior adesão (SOMASUNDARAM, *et al.*, 2003).

As características físicas da superfície vegetal como a rugosidade e hidrofobicidade influenciam, facilitando ou diminuindo a adesão das bactérias

nas superfícies (BASTOS, *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2009; ZHAO, *et al.*, 2014). As superfícies dos frutos e folhas são hidrofóbicas, principalmente pela presença de ceras cuticulares (TAFOLLA *et al.*, 2013).

Para o controle da qualidade microbiológica nas frutas e hortaliças, é comum a utilização de hipoclorito de sódio na lavagem e sanitização, em escala comercial (RUIZ-CRUZ *et al.*, 2007). A eficiência destes sanitizantes à base de cloro pode ser diminuída por vários fatores, como presença de matéria orgânica, hidrofobicidade e a rugosidade das superfícies (OLMEZ e KRETCHMAR, 2009). Assim, as soluções sanitizantes ao entrar em contato com a superfície hidrofóbica formam gotas maiores diminuindo tempo de molhagem da superfície, e impedindo o acesso destas gotas em lugares pequenos ou rugosos, (VELAZQUEZ *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009).

Além de todos os aspectos termodinâmicos e moleculares, no processo de adesão bacteriana também intervêm outros fatores como as características morfológicas e fisiológicas das bactérias, isto é, a presença de fimbrias, flagelo, e a capacidade de produção de exopolissacarídeos dos micro-organismos (REINA *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2010).

Os exopolissacarídeos podem facilitar o processo de adesão, ou causarem repulsão estérica e por tanto, diminuir a aderência (ZHAO, *et al.*, 2014). A adesão das bactérias nesta etapa é de difícil remoção.

2.4. *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* contaminação de tomate, maçã e rúcula

2.4.1. Tomate

O tomateiro pertence ao gênero *Lycopersicon*, sendo a espécie *Lycopersicon esculentum*, a mais cultivada (FERREIRA; FREITAS, 2005). No Brasil, disponível para comercialização, existem aproximadamente 700 cultivares de tomates registrados. Os frutos são classificados pelo seu

tamanho e formato nos grupos Caqui, Salada, Santa Cruz, Cereja, Italiano e Penca (SILVA *et al.*, 2007).

O tomate tipo italiano é alongado e bilocular, possui formato cilíndrico com até 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, sua massa média situa-se em torno de 150 g (SILVA *et al.*, 2007). Utilizados principalmente em molhos e no preparo de tomate seco (FILGUEIRA, 2008). Em relação aos híbridos convencionais, a sua vantagem é a coloração vermelha mais intensa e características sensoriais superiores como uma menor acidez (SHIRAHIGE, 2010).

O tomate é considerado fruto climatérico e, segundo Jacomino (2007), por ter essa característica apresenta comportamento diferente na atividade respiratória durante o armazenamento.

Na Figura 5, apresenta-se a classificação dos três estádios de maturação:

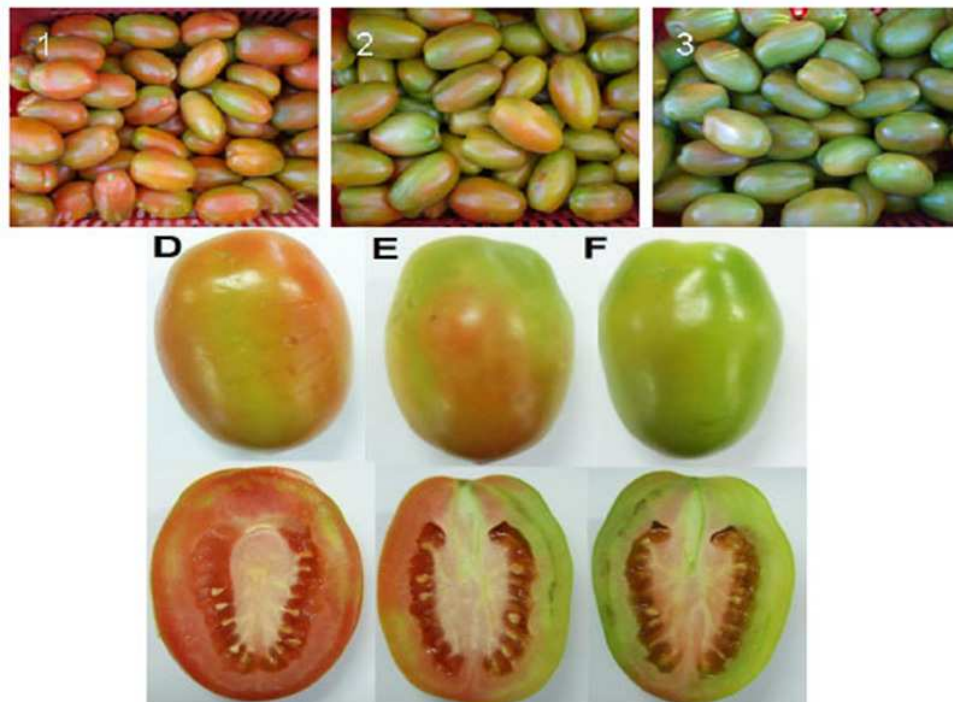


Figura 5. Estádios de maturação do tomate: (D) vermelho claro (estágio 1), (E) róseo (estágio 2) e (F) verde rosado (estágio 3)

O tomate contém de 93 % a 95 % de água, formado por ácidos orgânicos, compostos inorgânicos, açúcares, vitaminas, sólidos insolúveis em álcool e outros compostos. Apresentar alto teor de umidade, o tomate é danificado quando exposto à variações de temperatura, com os consequentes prejuízos a sua aparência pela perda de água (MARCOS, 2002).

As mudanças na pigmentação ao final do amadurecimento do tomate envolvem a biossíntese e acumulação dos carotenóides, particularmente do licopeno e em menor medida β -caroteno e, assim, a coloração vermelha do tomate fica cada vez mais intensa (BARGEL e NEINHUIS, 2004).

A textura também se altera durante o processo de amadurecimento, com a ocorrência de amolecimento do fruto de tomate, devido à degradação da parede celular causada por várias enzimas, como a poligalacturonase, pectinametil esterase e outras.

2.4.2. Maçã

A macieira (*Malus domestica Borkh*) é originária da Europa e Ásia e é pertencente à família *Rosaceae* que abrange mais de 100 gêneros e 2000 espécies espalhadas pelo mundo (IUCHI, 2006).

Na conservação pós-colheita, as principais alterações fisiológicas que ocorrem na etapa de maturação de maçãs são o aumento rápido da taxa respiratória (climatério), o aumento da síntese de etileno, a degradação da clorofila, formação de antocianina, conversão do amido em açúcar, produção de voláteis e diminuição da resistência da polpa (ARGENTA, 2006).

Nas maçãs, a epiderme está coberta com ceras epicuticulares que servem principalmente, para a reflexão da luz solar e a impermeabilização do fruto. Estas ceras são distribuídas, uniformemente, na superfície do fruto em forma de plaquetas (MONTERO *et al.*, 2010).

Durante o crescimento do fruto, ainda no campo, são produzidas microfissuras nas ceras epicuticular, com a conseguinte perda de água e,

assim as fissuras tornam-se pontos de apoio para a fixação de patógenos principalmente fungos.

2.4.3. Rúcula

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma hortaliça folhosa Figura (6) que tem apresentado um aumento da produção no Brasil, em razão da facilidade de seu cultivo e aceitação popular. A rúcula é uma hortaliça herbácea da família *Brassicaceae*, uma vasta família com mais de três mil espécies e na qual se incluem a couve, couve-flor, brócolis e o repolho, originária do sul da Europa, norte da África e da Ásia (HENZ e MATTOS, 2008).

A folha é a parte comestível e comercial da planta, sua cor é verde-claro a verde-escuro, forma alongada, recortada, tenra desenvolve-se bem em condições de clima ameno (MOURA CRUZ *et al.*, 2008). As análises físico-químicas, como sólidos totais, podem referenciar à maturidade das plantas de rúcula. (AROUCHA, 2010).



Figura 6. Folhas de rúcula

Do análise de 300 amostras (frutas, folhas e germinados) de produtos minimamente processados, comercializados em mercados varejistas de Cataluña (Espanha). Do total de amostras só nas folhas de rúcula foi encontrada *Salmonella* sp, correspondendo a 1,3 % do total de amostras analisadas, (ABADIAS *et al.*, 2008).

No Brasil, produtos minimamente processados como agrião alface, cenoura ralada, espinafre, repolho verde e rúcula foram avaliados quanto a sua qualidade microbiológica. *Salmonella* spp. foi detectada em 12,7 % das amostras mantidas a 5 °C (MACHADO *et al.*, 2009).

Em Piracicaba (Brasil), analisou-se a ocorrência de *Salmonella* spp. em 50 amostras de 5 marcas de hortaliças minimamente processadas, constatando-se que a mistura de folhas verdes como rúcula, alface, e manjerona picadas foram as que apresentaram maior problema de contaminação com esse patógeno (RAVELLI e NOVAES, 2005).

Em Ceará (Brasil) relataram a presença de *Salmonella* sp. em amostras de folhas de espinafre e rúcula anterior ao processamento mínimo e a sua persistência após o procedimento de sanitização (TRESSELER *et al.*, 2007)

Na sanitização de folhas verdes, a estrutura e topografia das folhas que serão sanitizadas influenciam na eficiência da limpeza e sanitização. Rúcula e chicória apresentam rugosidade e hidrofobicidade fatos que dificultam a sanitização, o que aumenta o risco de contaminação ao serem consumidas (SREBERNICH *et al.*, 2012).

Folhas de hortaliças minimamente processadas, vendidas ao varejo em mercados da Irlanda, foram analisadas, na procura de *Salmonella* sp. e outros contaminantes. Do total de amostras só 0,1% foi positivo para a presença de *Salmonella*, e foi nas folhas de rúcula (*Food Safety Ireland*, 2015).

2.5. Compostos amônio quaternário de amônio

Em geral, os compostos de amônio quaternário (CAQs) são compostos anfipáticos, uma vez que contêm grupos hidrofóbicos ("caudas") e grupos hidrofílicos ("cabeça") (Figura 1).

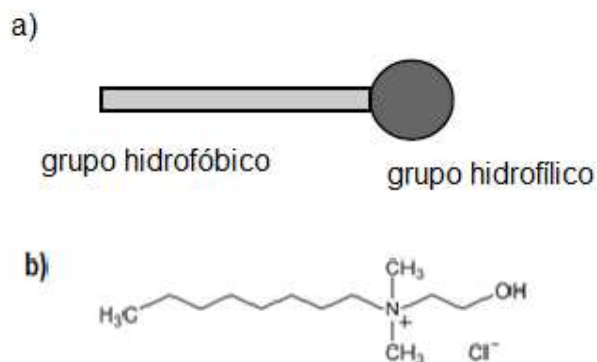


Figura 1. a) Representação esquemática de uma molécula anfifílica, em que a cauda representa a parte hidrofóbica da molécula, e a cabeça o grupo hidrofílico. b) tensoativo catiônico (molécula anfifílica). Fonte TADROS, 2005

‘Na figura estão representados alguns exemplos de sais de amônio quaternário a) cloreto de metil amônio, b) cloreto de etil amônio e c) cloreto de benzil amônio

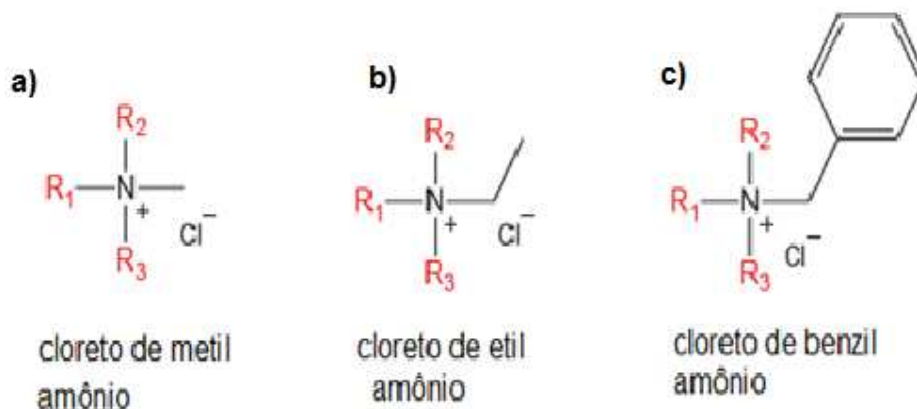


Figura 2. Estruturas moleculares de alguns sais de amônios quaternários, em que R=cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados. Fonte: Barbosa *et al.*, 2010

Estas substâncias possuem como estrutura básica a própria amônia em que cada hidrogênio é substituído por quatro radicais, R_{1-4} , em que: R_1 é quase sempre um grupo alquila C_{8-18} ; R_2 pode ser um grupo alquila de cadeia curta ou longa, o grupo aril; R_3 é em geral, grupo alquila de cadeia curta (TADROS, 2005). Os amônios quaternários pertencem a um tipo de substâncias denominadas tensoativos, cuja propriedade físico-química mais importante é a redução da tensão de superficial, com aumento deste modo suas propriedades de espalhamento e de molhagem.

Os CAQs, pela sua propriedade tensoativa, alteram as interações líquido-superfície, quando agregados à água, diminuem a tensão interfacial da mesma de 72,0 mJ/m² a valores próximos a 36,0 mJ/m² (ANDRADE, 2008), o que melhora a capacidade molhante do líquido sobre a superfície vegetal, e assim facilita a remoção dos micro-organismos (WOODS, 2004).

Outra propriedade importante dos tensoativos a concentração micelar crítica (CMC) que representa o ponto em que as moléculas, que se encontram como monômeros, agregam-se formando estruturas denominadas de micelas (DALTIM, 2011)

A concentração micelar crítica pode ser considerada a mais baixa concentração em que o tensoativo livre está em equilíbrio com as micelas. Existe então um equilíbrio dinâmico em concentrações superiores à CMC, em que a constante de equilíbrio é variável, pois a concentração de tensoativo organizado em micelas aumenta com o aumento da concentração total, apesar da concentração de tensoativo livre manter-se aproximadamente constante. (DALTIM, 2011). Dentro de qualquer classe de agente tensoativo, a CMC diminui com o aumento do comprimento do grupo alquila da cadeia hidrofóbica, (TADROS, 2005).

2.5.1. Atividade bactericida e fungicida dos compostos de quaternário de amônio.

Os CAQs pertencem ao grupo dos tensoativos catiônicos e manifestam a sua atividade antibacteriana comportando-se como indutores de enzimas autolíticas, que causam lises na parede celular, alteram o metabolismo de proteínas e provocam a desnaturação protéica e inibição enzimática (ANDRADE, 2008; SHABAN *et al.*, 2013).

A capacidade bactericida dos CAQs também foi associada à lipofilia dos derivados alquila C₁₂-C₁₄, isto para estirpes bacterianas gram-positivas e gram-negativas, (DALTIM, 2011).

A atividade bactericida dos CAQs varia em função do pH do meio, sendo as condições alcalinas as mais favoráveis. A faixa de pH ótimo para ação

antimicrobiana é de 6 a 10, e em pH menor que 3 são praticamente ineficientes (ZABIELSKA-MATEJUK, 2005). A sua ação bacteriostática e bactericida dependem da concentração utilizada, sendo a eficiência bactericida diminuída pela presença de proteínas ou material orgânico (SIMÕES *et al.*, 2005).

2.5.2. Mecanismos de atividade bactericida

Os tensoativos catiônicos caracterizam-se por adsorver-se às superfícies das membranas bacterianas. Esta adsorção ocorre em pontos da célula em que normalmente se adsorveriam compostos de nitrogênio necessários para a sua sobrevivência. Além disto, o tensoativo adsorvido impermeabiliza a superfície da célula bacteriana, e a muda de hidrofílica para hidrofóbica, impedindo o trânsito de nutrientes (RANGLES e BIRKELANDAD, 2007; DALTIM, 2011; LOTC *et al.*, 2011).

As membranas bacterianas são solubilizadas pelos CAQs na forma de micelas mistas. Isto poderia descrever-se como, uma inserção das moléculas de monômeros provenientes da solução de tensoativos, na membrana celular, outorgando-lhe certa fluidez e uma maior permeabilidade. Se a concentração do tensoativo é aumentada, mais monômeros inserem-se na bicamada celular, ao ponto de saturá-la e no final abri-la, formando micelas mistas de tensoativo e lipídeos, e micelas puras (MARTINEZ, 2010; ISRAELACHVILL, 2011).

As bactérias gram-positivas em geral são mais sensíveis que as gram-negativas à atividade bactericida dos tensoativos catiônicos (GUIQIAN *et al.*, 2007; LADOWA *et al.*, 2011). Entretanto, os valores da (CIM) para os tensoativos catiônicos são iguais ou próximos aos valores da concentração bactericida mínima (DALTIM, 2010; LADOWA *et al.*, 2011).

A diferença nos valores de (CBM) entre bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas para o CETAB pode ser inerente ao tipo de célula bacteriana. Nas bactérias gram-positivas, a membrana citoplasmática está rodeada por uma parede celular espessa composta por uma camada de peptidoglicano (LADOWA, *et al.*, 2011). Bactérias gram negativas têm uma

membrana citoplasmática, rodeada de uma fina camada de peptideoglicano e uma membrana externa composta por glicerofosfolídeos e lipopolissacarídeos, que evitam que os tensoativos catiônicos possam atravessar a membrana celular com facilidade (PARISH *et al.*, 2003; TIECCO *et al.*, 2013).

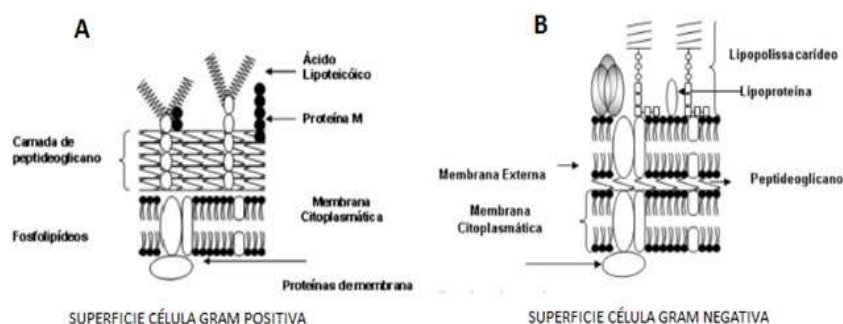


Figura 3. Representação esquemática das membranas celulares das bactérias gram-negativa (A) e bactéria gram-positiva (B). (Araújo, 2010)

Os tensoativos catiônicos são afetados na sua atividade bactericida pela presença de matéria orgânica. A ação do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) sobre *Pseudomonas fluorescens* teve a sua atividade bactericida diminuída pela presença de albumina bovina (SIMÕES *et al.*, 2005; LAVILLA LERMA *et al.*, 2013). A eficiência biocida do CTAB foi menor ainda quando aplicado sobre biofilmes de *P. fluorescens* com 7 dias de crescimento sobre cupons de aço inoxidável (SIMÕES *et al.*, 2005).

Entretanto, Ibuzquisa *et al.* (2012), relataram a atividade bactericida do BAC na eliminação de biofilmes simples e/o mistos formados por *P. putida* e *L. monocytogenes*. Nesse caso, o BAC eliminou praticamente 100 % das células em ambos os tipos de biofilmes.

Jaramillo *et al.* (2012) relataram a inibição na formação de biofilme bacteriano na superfície tratada com cloreto de benzalcônio na superfície de discos de dentina.

Em *S. aureus* o cetiltrimetilamônio provoca um extravasamento de metabólitos com baixo peso molecular pela modificação da permeabilidade da membrana celular. Esta atividade bactericida é afetada pelo comprimento, ramificações e substituintes da cadeia hidrofóbica do tensoativo (SHABAN *et al.*, 2013).

Aplicações repetitivas de CAQs têm induzido resistência microbiana e diminuído a efetividade no controle de fungos e bactérias, em função da estrutura molecular do composto quaternário utilizado. Entretanto, em cepas de bactérias de *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Vibrio sp.*, e *Aeromonas sp.* foi detectada baixa e nenhuma indução de resistência à aplicação repetitiva de CAQs (SIDHU *et al.*, 2002). Porém, foi encontrada alta indução a resistência em cepas de *Pseudomonas sp.*, pela atividade da bomba de efluxo (LUCCHESSI, *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011).

2.5.3. Mecanismo de atividade fungicida

Culturas de frutos e hortaliças são afetadas por fungos fito patogênicos que causam perdas na produção agrícola. No controle destes patógenos, diversos fungicidas com diferentes mecanismos de ação são utilizados para reduzir a colonização e desenvolvimento dos fungos (PUNJA e UTKHEDE, 2003)

Os fungos por sua vez utilizam diferentes estratégias de infecção nos vegetais, alguns como *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, e *Fusarium* que formam hifas de infecção dentro do hospedeiro, secretam peptídeos e toxinas ou provocam a morte celular do hospedeiro por secreção de espécies reativas de oxigênio. *Botrytis cinerea* causa oxidação durante a penetração de cutícula e formação da lesão (HORBACH *et al.*, 2011).

O cloreto de benzalcônio (BAC) quando aplicado sobre as plantas estimula a autodefesa do vegetal e também tem uma ação direta sobre o patógeno *Hemileia vastatrix* pela inibição, da germinação dos esporos do fungo e da formação de oressórios. Este produto pode apresentar um efeito fungistático, suprimindo a esporulação das pústulas de ferrugem, na maioria dos casos, de forma temporária (MARTINS *et al.*, 2009).

Os compostos de amônio quaternário têm a atividade antifúngica, atribuída à adsorção eletrostática da molécula carregada positivamente sobre a membrana do fungo, em seguida a molécula se dissocia e o amônio se insere na membrana do micro-organismo, causando-lhe a mudança da carga da superfície, o que induz a lise do micro-organismo, conforme mecanismo proposto por Leclercq *et al.*(2012).

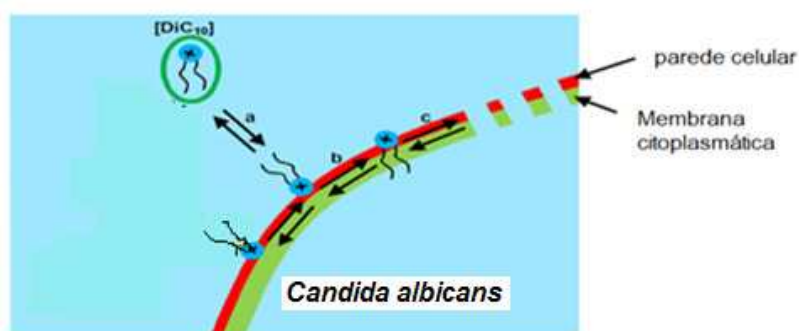


Figura 4. Representação esquemática da atividade biocida sobre *Candida albicans*, de compostos de amônio quaternário. (a) Interação eletrostática livre DIC₁₀ com a membrana celular (b) Inserção de DIC₁₀ na parede da célula ou na membrana citoplasmática, (c) lise da parede celular e da membrana citoplasmática. Os círculos verdes são espécies ativas. Fonte. Adaptado de LECLERCQ *et al.*,2012.

Alguns fungos patogênicos são capazes de formar biofilmes, compostos de células com metabolismo alterado e rodeado por uma matriz extracelular, o que faz com que toda a estrutura fique resistente aos compostos antifúngicos, (SIQUEIRA e LIMA, 2013).

Relatos indicam que os sais de amônio quaternário monoméricos são eficientes para controle de biofilmes formados por fungos, os sais de amônios gêmeos conseguem também destruir até 60 % do biofilme formado por *C. albicans*, porém incrementos da concentração dos sais de amônio quaternário gêmeos não se refletem em uma maior diminuição do biofilme fúngico (OBLAK *et al.*,2013).

2.6. Sanitização de frutas e hortaliças

Sanitizante é um produto que reduz o número de bactérias a concentrações seguras de acordo com as normas de saúde, e a sanitização é o processo de aplicação do sanitizante para assegurar a qualidade microbiológica das superfícies (ANDRADE, 2008).

Sanitizantes e fungicidas são aplicados nas operações de lavagem e sanitização de frutas e hortaliças para prolongar a vida-de-prateleira pós-colheita (EL GHAOUTH *et al.*, 2004; KORSTEN, 2006; ZHU, 2006; SINGH e SHARMA, 2007), em especial naquelas de alto valor comercial ou para as exportações como no caso da maçã, laranja, banana, manga, melão e limão.

O cloro, nas suas variadas formas, é o sanitizante, sendo mais usado em alimentos como antimicrobiano de amplo espectro de ação (CHEN e ZHU, 2011), que reage com as proteínas da membrana de células microbianas, formando composto nitrogênio-cloro, interferindo no transporte de nutrientes e promovendo a perda de componentes celulares. Concentrações de 50 mg/L a 200 mg/L de cloro residual podem inativar as células vegetativas de bactérias, mas a concentração deve ser determinada para cada produto (SANCHEZ *et al.*, 2009)

A temperatura da água deve ser mantida na faixa de 8 °C a 10 °C e o tempo de imersão pode variar de 2 a 30 min (HUANG e CHEN, 2011). O pH da água é fator determinante na eficiência do cloro e deve ser controlado em torno de 6,5 a 7,0. (ZAGORY, 1999).

A ação do ácido hipocloroso é dependente de pH, sendo que sua concentração aumenta com o aumento da concentração hidrogeniônica. Assim, os compostos clorados são mais efetivos em valores de pH abaixo de 7,5 quando a proporção de ácido hipocloroso é maior (ANDRADE, 2008).

A população microbiana é reduzida, em média dois ciclos logarítmicos pela ação do hipoclorito de sódio, em concentrações de rotina na indústria de alimentos 100-200 mg/L de CRT, pH 9,5 e temperatura de 25 °C. (COSTA, 2012) Concentrações maiores de cloro podem promover redução mais acentuada na contaminação microbiana de alguns produtos, mas podem ocorrer problemas como descoloração, perda de qualidade, e formação de

trihalometanos que representam riscos à saúde dos consumidores (RIBERA, 2010).

Outro produto à base de cloro é o dicloroisocianurato de sódio, que pertence ao grupo substâncias do grupo denominado de cloraminas orgânicas. As mais utilizadas são as formas sódicas do ácido dicloroisocianúrico e do ácido tricloroisocianúrico, que têm maior estabilidade que o hipoclorito de sódio (ANDRADE, 2008). O pH da solução a 1 % do dicloroisocianurato de sódio varia de 6,0 a 8,0 enquanto do hipoclorito de sódio varia de 11,0 a 12,5

Na indústria de alimentos, os compostos clorados podem ser utilizados para a redução do número de micro-organismos em carcaças bovinas e em frutas e hortaliças minimamente processados (ANDRADE, 2008).

2.7. Controle microbiano em superfícies vegetais com compostos de quaternário de amônio

Compostos de amônio quaternário (CAQs) representam uma classe altamente eficaz como ingredientes ativos em produtos antimicrobianos contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. A eficiência da sua atividade depende do tamanho da cadeia hidrofóbica (LADOWA *et al.*, 2011), número de ramificações (SHABAN *et al.*, 2013), pelas variações do grupo polar e presença de uma ou duas terminações catiônicas (TIECCO *et al.*, 2013), e a interação molecular com as superfícies dos micro-organismos e dos vegetais (ISRAELACHVILI, 2011).

A propriedade tensoativa dos QAC's permite seus cátions difundirem e aderirem nas superfícies porosas, como nas superfícies dos frutas e hortaliças de cutícula hidrofóbica multicamada, composta de cutina e moléculas amorfas de cera, responsáveis pela hidrofobicidade (TADROS, 2005; ISRAELACHVILI, 2011).

Estes compostos foram utilizados em laranjas em que a população bacteriana foi reduzida em aproximadamente 95 %, pelo uso de cloreto de benzalcônio a 200 mg/L (WINNEZUK, 1994). A sanitização de hortaliças minimamente processadas de aipo (*Apium graveolens*) e repolho branco

(*Brassica oleracea*), tratados com cloreto de benzalcônio, na concentração de 10 % reduziu a população microbiana em, no máximo, 2 RD (LOPEZ *et al.*, 2003).

Cloreto de benzalcônio reduziu a microbiota de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* aderidas na superfície de folhas de alface em 1,9 RD, apresentando, assim, relativa ação bactericida sobre os biofilmes (CARELI, 2009),

Maçãs cv. *Red Delicious* contaminadas com *Erwinia amylovora* tiveram microbiota reduzida em 50 %, após tratamento de imersão em cloreto de benzalcônio, com concentração de 2000 mg/L (ROBERT e REYMOND, 1989).

O cloreto de benzalcônio apresenta também atividade antifúngica, (ZABIELSKA-MATEJUK, 2005). Abreu *et al.* (2008), relataram que o BAC se apresentou eficiente no controle *M. frutícola*, causador podridão parda pós-colheita e ineficiente no controle de *R. stolonifer*, agente etiológico da podridão mole.

Compostos de amônio quaternário são eficientes contra *Fusarium*, para aplicação em bananas, sendo mais eficientes que o cloro (NEL *et al.*, 2007). Outros fungos comuns na pós-colheita de frutas e hortaliças são *Aspergillus* e *Penicillium* spp. que dispersam a contaminação por propagação micelial dos frutos contaminados aos sadios. O BAC isolado e combinado com ácido etilendiaminotetracético (EDTA) foi eficiente para inibir a germinação de conídios e crescimento micelial destes fungos (BASARAN, 2011).

A União Europeia estabelece que os limites máximos de resíduos (LMR) 0,1 mg/kg de cloreto de benzalcônio para alimentos de origem vegetal (AECOSAN, 2014)

Diversos sanitizantes são utilizados a fim de manter a qualidade microbiológica de frutas e hortaliças e os compostos de quaternário de amônio se apresentam como uma alternativa a ser avaliada.

3. REFERÊNCIAS

- ABADIAS M., USALL J., ANGUERA M., SOLSONA, VIÑAS, Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments, **International Journal of Food Microbiology** V123 , 121–129, (2008).
- ABREU, F. M. de. Quantificação de danos e controle pós-colheita de podridão parda (*Monilinia fructicola*) e podridão mole (*Rhizopus spp.*) em pêssegos. 95 F. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ADLEY, C.; DILLON, C.; MORRIS, C.P.; DELAPE, N.; CORMICAN, M., Prevalence of *Salmonella* in pig ear pet treats. **Food Research International**. v. 44, p. 193–197, 2011.
- AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria e Nutrición; Presencia de compostos de amônio quaternário en los alimentos, Reglamento de EU 1119/ 2014
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, p.922, 2005,
- ANDRADE, N.J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. São Paulo, Varela, 2008.
- ARAÚJO A. E., ANDRADE N.J., CARVALHO A. F., RAMOS A.M., SILVA A.S., Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos, **Química Nova**, vol. 33, Nº 9, 1940-1948, 2010.
- ARGENTA, L. C. **Fisiologia pós-colheita**: Maturação, colheita e armazenagem dos frutos. IN EPAGRI. A cultura das macieiras. Florianópolis: EPAGRI 2006.
- AYTAC, A.; BEM. U.; CENGİZ, C.; MERCANOGLU, B., Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables Sait, **Journal of Food, Agriculture & Environment** Vol.8 (2): 275-279. 2010
- BADOSA, E., TRIAS, R., PARÉS, D., PLA, M. AND MONTESINOS, E. 2008. Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). **J.Sci.Food Agr.** 88:605-611, 2008.

BASARAN, P. Inhibition effect of belzalkonium chloride treatment on growth of common food contaminating fungal species, **Association of Food Scientists & Technologists (India)** 2011.

BENITO, E.P. ARRANZ, M. ESLAVA, A.P., Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. **Revist. Iberoam. Micol.** v. 17, p. 543 – 546, 2000.

BEUCHAT, L.R., Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes Infect.** 4, 413 e 423. 2002

BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M. A., Yeast and molds. In. DOWNES, F.P., and K. ITO (ed.) **Compendium of Methods for the microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health association, Washington. D.C., Chapter 20, p. 209 – 215, 2001.

BERGER C., SODHA S. V., SHAW R.K., GRIFFIN M. P., PINK P. H., FRANKEL G., Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens, **Environmental Microbiology**. v.12, n 9, p. 2385–2397, 2010.

CARELI, T.R., Ocorrência de *Cryptosporidium* spp na cadeia produtiva da alface (*Latucasativa*), sua captura e retenção por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*, e seu controle por surfactantes, **tese de doutorado UFV**, 2009.

CARVALHO, V., L; CUNHA, R. L; CHALFUN, N.N.J., ABREU, M. P. H. Alternativas de controle pós-colheita da podridão-parda e da podridão-mole em frutos de pessegueiro. **Rev. Bras. Frutic.** vol.31, n.1, p.78-83, 2009.

COSTA, R.R.; THIEL, F. B.; FERREIRA, L.V.; VARGAS, D.P.; DUTRA, L.F.; ANTUNES, L.E.C.; Desinfestação de explantes de mirtilo, cvs. Misty e O'neal. VI Simpósio Nacional do Morango. **V Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas** Do MERCOSUL. p.145, 2012.

DALTIN, D., Tensoativos, química, propriedades e aplicações, EDITORIAL BLUCHER A., 2011.

DEL-CAMPO, N.; QUIROZ, C. C. CARRASCO, W.R.; TORRES, J.B., Sobrevivência de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos minimamente processados, *Rev Cubana Salud Pública* v.30 n.1, Ciudad de La Habana ene.- mar., 2004.

FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, R. J. S. O tomate de mesa: origem, taxonomia e variedades. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 135, n. 19, p. 34-39, set. 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. Solanáceas II – Tomate: a hortaliça cosmopolita. In: Novo manual de olericultura: **Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, p. 194-241, 2008.

FILLINGER, S.; ELAD, Y., **Botrytis Fungus, the pathogen and its management in Agricultural Systems**, p. 486, 2016.

FISCHER I.H.; ARRUDA M.C.; ALMEIDA, A.M.; MONTES S.M.N.M.; JERÔNIMO, E.M.; SIMIONATO, E.M.R.S.; BERTANI R.M.A. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em manga Postharvest diseases and physicochemical Characteristics of mango. Seminario: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 107-116, jan./mar. 2009.

FREITAS-SILVA, O.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, E. M. M. Potencial da ozonização no controle de fitopatógenos em pós-colheita. In: Luz, W. C. da. (org.). **Revisão anual de patologia de plantas**. 1.ed. Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, v.21, p.96-130. 2013.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, P.109-132,2007

GARRIDO LR, SÔNEGO OR. Uvas Viníferas para processamento em regiões de clima temperado: Doenças fungicas e medidas de controle. **Embrapa Uva e Vinho**. Sistema de reprodução, Versao Eletronica. 2003.

GEEP, V.; VERO, S.; CASSANELLO, M. E.; ROMERO, G.; SILVERA ,E;GONZÁLEZ P.; REBELLATO,J.; FERREIRA, Y.; BENTANCUR,O.; Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. **Agrociencia Uruguay**. v.16 p. 97-107. 2012

GIRARDI, C. L. Manejo pós-colheita e rastreabilidade da fruta na produção integrada. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 213, p. 75-78,2001;

GONÇALVES, C.T.; CARVALHO, M, V. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* sp. **Revista. Inst. Ciênc. Saúde**, v. 24, p. 95 -101, 2006.

HENZ, G.P.; MATTOS, L.M. Manuseio pós-colheita de rúcula; (Embrapa Hortaliças. Boletim **J. de Pesquisa e Desenvolvimento**, 34) p.13; 2007.

HOELZER K., POUILLOT R., GALLAGHER D., SILVERMAN M. B., KAUSE J., SHERRI D., Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation, **International Journal of Food Microbiology** 157, 267-277, 2012

HORBACH, R. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of plant physiology**, 168(1), pp.51–62, 2011.

HUA, G. H., RECKHOW, D. A. (2007). Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. **Water Research**, 41(8), 1667–1678. (2007).

ISRAELACHVILI, J. N., **Intermolecular and Surface forces**, Elsevier, printed in USA, 2011.

IUCHI, V. L. Botânica e fisiologia In: **EPAGRI**. A cultura da macieira. Florianópolis:2006

JOHANNESSEN, G.S., LONCAREVIC, S., e KRUSE, H. Bacteriological analysis or fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.199-204. 2002.

LADOWA, J.E.; WARNOCK, C.D.; HAMILL, K. M.; SIMMONS, K .L DAVIS W. R. ; SCHWANTES C.R.; FLAHERTY, C.D.; WILLCOX, J.A.L.; WILSON-HEMJUM, K. ;CARAN K. L. ; MINBIOLE, K.; SEIFERT. K., Cephalic amphiphile architecture affects antibacterial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.46, p. 4219 - 4226, 2011.

LECLERCQ, L.; NARDELLO-RATAJA, V.; RAUWELB, G.; AUBRYA, J.M., Structure–activity relations hipofcyclodextrin / biocidal double-tailed ammonium surfactant host–guest complexes: Towards a delivery molecular mechanism **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 265–275, 2010.

LICHTER J.A, VAN V., RUBNER M.F., Design of antibacterial surfaces and Interfaces: polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform, **Macromolecules** 42 (2009) 8573–8586, 2009.

LOPEZ L. V, ROMERO, J., DUARTE, F. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pre-trozados expendidos en Chile. **Universidade de Chile** 2003.

LUCCHESI G.; LIFFOURRENA, A. S.; SALVANO B.; SALVANO M. Adaptative response and degradation of quaternary ammonium compounds by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633. Department of Molecular Biology, **Universidad Nacional de Río Cuarto**, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

MACHADO, O.S.M. Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis. Dissertação de mestrado. **Universidade do Minho**. p.114, 2005

MACHADO, T.F; C.M. DELFINO; P.H.M. SOUSA. Microbiological quality evaluation minimally processed vegetables. In Tressler, J.F.M *et al.*, 1722. **Cienc. Agrotec.** Lavras, v. 3. Edição Especial, p.1722-1727, 2009.

MARCOS, S. K.; JORGE, J. T. Desenvolvimento de tomate de mesa, com o uso do método QFD (Desdobramento da Função Qualidade), comercializado em um supermercado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 3, p. 490-496, set. 2002.

MIRA I, CARVALHO CDF, VIOLA DN. Composição ideal da solução filmogênica adicionada de prebiótico, aplicada em uvas ‘Thompson’ **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 37, n. 2, p. 308-317, Junho 2015

MOURA CRUZ A.L., BATISTA DO CARMO T.V., NASCIMENTO S.V..1 ; CASTRO C.E., DA COSTA, MARTINS E.R.. Caracterização morfológica de variedades comerciais de rúcula (eruca sativa), **Hortic. bras.**, v. 26, n. 2 (Suplemento - CD Rom), jul-ago. 2008

NICOLI A.; ZAMBOLIM L.; MARO L.A.C.; ROMA R.C.C.; DUARTE H.S.S. Comparação da eficiência entre produtos alternativos e fungicidas no controle de bolor verde em laranja. Revista Tropical – **Ciências Agrárias e Biológicas**, V. 3, N. 2, pag. 12, 2009.

OBLAK E., PIECUCHA, A., KRASOWSKA, A., ŁUCZYNSKI, J. Antifungal activity of gemini quaternary ammonium salts. **Microbiological Research**, v. 168, p. 630–638; 2013.

OCHOA, F.M.I.; RODRÍGUEZ, ANTONIO VERDUGO, Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* sp. **Rev. Latinoamericana de Microbiologia**. v. 47, n. 1-2; 2005

OFOR, M.O., OKORIE, V.C., IBEAWUCHI, I.I., IHEJIRIKA, G.O., OBILO, O.P. AND DIALOKE, S.A. Food Safety Microbial Contaminants in Fresh Tomato Wash Water and Food Safety Considerations in South-Eastern Nigeria, **Life Science Journal**, 2009.

OLIVEIRA, K; OLIVEIRA, T., TEIXEIRA, AZEREDO, J. OLIVEIRA, R., Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces, **Brazilian Journal of Microbiology** 38:318-323, (2007).

OMS, World, *Salmonella* (non-thypoidal), Healt Organization, Fact sheet N° 139 agosto 2013.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANECO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, n.2, 2008.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Vol. II. Passo Fundo, RAPP, p.1-52. 1994.

PONTES C.N.; NASCIMENTO, R. A.; VERDU, M.O.R.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Avaliação do cloreto de dodecil dimetil amônio para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, **BIOCIENCIA, J. UBERLANDIA**. v.28, n. 1. p. 43-47, Jan./Feb. 2012.

RAMOS, B.F.A. MILLER, T.R.S. BRANDÃO, P. TEIXEIRA, C.L.M. SILVA, Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety, **InnovativeFood Science and Emerging Technologies**, v. 20, p.1–15, 2013.

RAVELLI M.N., TONETO N.A. P., Análise Microbiológica de Hortaliças minimamente Processadas e Comercializadas no Município de Piracicaba, SP.2006

REINA L.D.; FLEMING H.P. e BREID F. J.R. ; Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion, **Journal Food Protection**, v. 65, n° 12 p. 18881-18887, 2002

REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry** v.47 p.540–549, 2009

RIBERA L.F., ESPLUGUES A.; FERRAN B.; MARTINEZ-ARGUELLES B.;TARDON A.; FREIRE C.; FERNANDES M.F.; CARRASCO G.; CASES A.; SUNYER J.;VILLA NUEVA C.N., Trihalometanos en agua de piscinas en cuatro zonas de España. **Gaceta Sanit**, 24(6); p.483-486. 2010.

RUIZ-CRUZ S.; ACEDO-FELIZ E.; DIAZ-CINCO M.; ISLAS-OSUNA M.; GONZALES-AGUILAR, G.A. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* populations on fresh CUT carrots. **Food Control**. Volume 18, Issue 11,p. 1383-1390, 2007.

SAUDERS, B.D., SANCHEZ, M.D., RICE, D.H., CORBY, J., STICH, S., FORTES, E.D., ROOF, S.E., WIEDMANN, M., Prevalence and molecular diversity of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2337–2349, 2009

SAUNIER J., HERRY J.M, MARLIÉRE C. RENAULT M., BELLON-FONTAINE. M.N., YAGOUBI N. Modification of the bactéria adhesion of

staphylococcus aureus by antioxidant blooming on polyurethane films. **Material Science and Engineering**, v.56, p.522-523, 2015.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, p.227-248,2008.

SHABAN, S.M.; SAIED, A.; TAWFIK, S.M.; ABD-ELAAL, A.; AIAD, I., Corrosion inhibition and some cationic surfactants based on Schiff base, **Industrial and Engineering Chemistry** v. 19, p. 2004–2009, 2013.

SHIRAHIGE, F.H.; MELO A. M. T.; PURQUERIO, L. F. V.; CARVALHO, C.R.L.; MELO, P. C. T. Produtividade e qualidade de tomates Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 28, n. 3, p. 292-298, jul./set. 2010

SILVA J.B.C.; GIORDANO L.B. Tomate para processamento industrial. Brasília, EMBRAPA, **Comunicação para transferência de tecnologia**. 168p. 2000.

SILVA, J. H. da, FONTES, P. C. R.; MIZUBUTI, E. S. G.; PICANÇO, M. C. Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: PAULA JÚNIOR, T. J. de; VENZON, M. (Coord.). **101 Culturas manual de tecnologias agrícolas**. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, p. 735-750, 2007.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, J. M., Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms for med under different flow regimes. **Water Research**. V.39 p. 478–486, 2005.

SKANDAMIS P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; & NYCHAS, G. J. E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on E.coli 0157:H7. **Italian Journal of Food Science, Roma**, v. 13, p. 55- 65, 2001.

SREBERNICH S.M., ARRUDA N.F., SILVEIRA, GONÇALVES S; M; Occurrence of *Salmonella* in Minimally Processed Vegetables, Institute of **Food Technology**, Campinas-SP, Brazil

SOMASUNDARAM, P.; MARKOVIC, B.; YU, X., KRISHNAKUMAR, S. In. BIRDI, K.S.(Ed.). **Handbook of surface and colloid chemistry**, CRC. Press. Lincoln, 2003.

SPOTO, M.H.F. Pós-colheita de frutas e hortaliças Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/FrutasHortalicas.pdf> Acesso em: 20/03/2014.

SIQUEIRA, V.M.; LIMA N., Biofilm formation by filamentous fungi recovered from water system, **Journal of Mycology**, p. 9, 2013.

TAFOLLA, J.A., GONZALES-LEON A., TIZNADO-HERNANDEZ M., GARCIA Z. L., BÁEZ R.S. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas, **Rev. Fitotec. Mex.** v. 36, p. 3 - 12, 2013

STEENACKERS H., HERMANS K., VANDERLEYDEN, J., KEERSMAECKER, D., *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication, **Food Research International**, v. 45, p.502–531, 2012

TADROS T. F; **Applied Surfactants principles and Applications**; WILEY –VCH VERTAG GMBH & Co KGaA Weinheim, 2005.

TRESSELER, M. F. J.; TEXEIRA DE FIGUEIREDO, E.A.; FIGUEIREDO, R.W.; MACHADO, F. T.; DELFINOS, C. M.; SOUSA, M.P.H., Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas; **Cienc. Agrotec., Lavras**, v. 33, p.1722-1727, 2009.

THUNBERG R.L., TRAN, T.T, BENNETT RW, MATTHEWS R.N, BELAY N, Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. **J. Food Prot.** Apr. 65, p. 677-82, 2002.

TIECCO, M.; CARDINAL, ROSCINI, L.; GERMANI, R.;CORTE, L., Biocidal and inhibitory activity screening of de novo synthesized surfactants against two eukaryotic and two prokaryotic microbial species, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.111, p. 407– 417, 2013.

UKUKU, O.D; SAPERS, G.M. Effect of Sanitizer Treatments on Salmonella Stanley Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-cut Tissues during Cutting Practices. **Journal Food Protection**. V. 64: p.1286-1291, 2001.

VAN DER VEEN S., ABEE, T., Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid, **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p. 421–431, 2011.

van Oss C.I. GIESSE.R.F. The hydrophilicity and hydrophobicity of Clay Minerals. *Clay Minerals* v.43, p. 474 – 477, 1995.

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 p.262-268, 2009.

WOODS, C.W. 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**, p. 110. 2004.

YARON S., ROMLING U., Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence, **Microb Biotechnol**, v.7, p.496–516, 2014.

YOUNG-OH S., JI-HYUN J., KEABG-DEOG M., Occurrence and characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolate from minimally processed vegetables and sprouts in Korea, **Food Science and Biotechnology**, v. 19 issue 2 , p. 313-319 , 2010.

ZABIELSKA-MATEJUK J. Antifungal properties of new quaternary ammonium compounds in relation to their surface activity. **Wood Science Technology**, v. 39: p.235-243, 2005.

ZAGORY, D., Sanitation concerns in the fresh cut Fruit and vegetable industry, **University of California Davis**, 1999

ZHANG X., WANG L., LEVÄNEN, E., Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion, *RSC Adv.* 3 , 12003–12020, 2013.

ZHANG Z, QIN G, LI B. TIAN S. Infection assays of tomato and apple fruit by the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **Bioprotocol** 4(23):e1311. 2014. <http://www.bioprotocol.org/e1311>

ZHANG, Q.Y., ZHOU, W.W., WANG, X.F., XU, J.F. Response surface methodology to design a selective co-enrichment broth of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* for simultaneous detection by multiplex PCR, **Microbiological Research** v.167 ; p. 405– 412, 2012

CAPITULO 2.

Determinação da atividade antibacteriana dos compostos de quaternário de amônio, *in vitro* para *Salmonella* Enteritidis; *Staphylococcus aureus* e os fungos filamentosos *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*.

RESUMO

A atividade antimicrobiana de cinco soluções sanitizantes, preparadas a partir do cloreto de alquilbenzil dimetilamônio (BAC), cloreto de metil trialquil amônio (CMTA), cloreto benzil dimetil amônio (CBDMA), metil dodecil benzil trimetil cloreto de amônio (CMBTA) e de um formulado comercial contendo (BAC+etilbenzalcônio (ETB)) foi avaliada, *in vitro*, pelos testes de difusão em meio sólido e de macrodiluição. Dos cinco produtos testados, o CMTA não apresentou atividade antimicrobiana sobre *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* nem sobre *Penicillium expansum*, *P. digitatum* e *Botrytis cinerea*, no teste de difusão em meio sólido. As soluções de CMDA e CBDMA apresentaram maior atividade bactericida, mas foram pouco efetivos contra os fungos. A solução de CBDMA teve boa atividade antibacteriana com halos de inibição de 19,2 mm e 22,7mm para *S. aureus* e *S. Enteritidis*, respectivamente e a solução de CMDA inibiu a multiplicação bacteriana com diâmetros de 13,7 e 14 mm para as duas espécies testadas. Os produtos com maior atividade antifúngica foram o BAC na concentração de 4000 mg/L e o (BAC+ETB) na concentração de 100 mg/mL. As concentrações inibitórias mínimas (CIM), determinadas pelo teste de difusão em meio sólido, foram de 0,12 mg/mL do BAC para *S. Enteritidis* e de 0,06 mg/mL para *S. aureus* e de 6,25 mg/mL do (BAC+ETB) para *S. Enteritidis* e de 3,12 mg/mL para *S. aureus*. Em relação ao teste de macrodiluição, verificou-se que as CIMs determinadas foram iguais entre si, para as suspensões das duas espécies de bactérias, e menor em valor, comparada a obtida no método de difusão em meio sólido para o composto BAC. Os valores

das CIMs para o BAC e (BAC+ETB), foram de 0,03 mg/mL e de 3,12 mg/mL, respectivamente para as duas espécies bacterianas avaliadas.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos de amônio quaternário (CAQs), pertencem à classe dos tensoativos catiônicos, são de origem sintético e em solução aquosa, se dissociam originando íons carregados positivamente (TADROS, 2005).

Os (CAQs) geralmente são representados pelo cloreto de benzalcônio (BAC), que é uma mistura de cloretos de alquil benzil dimetil amônio, cuja fórmula geral é $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R] Cl$, onde R representa uma mistura de todos os alguns dos homólogos de diferentes comprimento de cadeias alquílicas, variando entre C_8 e C_{17} ; $nC_{12}H_{25}$; $nC_{14}H_{29}$; $nC_{16}H_{33}$ e $nC_{18}H_{37}$. (GILBERT e MOORE, 2005).

Os CAQs disponíveis comercialmente utilizam óleos naturais, como os de soja e coco, estes são as fontes dos substituintes da cadeia de alquila, que será por conseguinte, altamente diversa, em comprimento e também no grau de insaturação presente entre C-C, (GILBERT e MOORE, 2005).

Cada um dos fatores acima mencionados, irá afetar significativamente a atividade antimicrobiana dos CAQs, (GILBERT e MOORE, 2005). Assim por exemplo maior atividade bactericida, com maior comprimento da cadeia hidrofóbica, para quaternários de amônio poliméricos, mas esta atividade bactericida diminui com a diminuição da solubilidade (GUIQIAN, *et al.*, 2007).

Os tensoativos catiônicos de quaternário de amônio são utilizados como biocidas em ambientes médicos, e nas áreas de processamento de alimentos, sendo o BAC o mais utilizado (GILBERT e MOORE, 2005; BORE *et al.*, 2006) e também como agente tensoativo e conservante em produtos farmacêuticos e produtos de higiene pessoal (HOLAH *et al.*, 2002; MOEN *et al.*, 2012).

Uma característica dos quaternários de amônio é a elevada adsorção nas superfícies carregadas negativamente como são as superfícies dos sólidos e as superfícies das células bacterianas. E ao mesmo tempo a parte

hidrofóbica dos CAQs se integra à membrana citoplasmática, com a consequente perda de fluidez da mesma. Isto influencia a atividade bactericida dos compostos de quaternário de amônio, que está principalmente associada à lipofilia dos derivados alquil C_{12} e C_{14} (DALTIM, 2011).

A baixas concentrações (próximas à concentração inibitória mínima CIM) a interação se dá com o nitrogênio positivo e as cabeças dos fosfolípidios da membrana, aumentando a pressão superficial. A membrana sofre uma transição e passa do estado de fluido a estado cristalino-líquido diminuindo a sua capacidade osmorregulatória e funções fisiológicas.

A concentrações de uso os compostos de quaternário de amônio formam agregados micelares mistos, que se solubilizam com o componente hidrofóbico da membrana citoplasmática (GILBERT e MOORE, 2005).

Para a seleção de produtos sanitizantes e a determinação da sua atividade antimicrobiana, são utilizados testes *in vitro*. Esses testes permitem a otimização das dosagens dos sanitizantes, o que reduz o risco de que os micro-organismos criem resistência aos bactericidas por sub-dosagem (EBRAHIMI *et al*, 2015).

Entre os métodos mais utilizados para determinar a atividade antimicrobiana das substâncias, podemos mencionar os métodos de difusão em ágar e os de macrodiluição e microdiluição.

O teste de difusão em ágar, é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância antimicrobiana, inoculada em meio do ágar sólido, e relaciona o diâmetro do halo de inibição de crescimento do micro-organismo desafiado, com a concentração da substância antimicrobiana que está sendo avaliada, M7-A6 (CLSI, 2003).

As técnicas de aplicação do agente antimicrobiano no método de difusão são por meio de discos de papel, e perfuração de poços em ágar. A técnica de difusão em disco faz referência à difusão de um agente antimicrobiano, a uma determinada concentração, a partir de um disco, que é depositado em um meio de cultura sólido, que foi semeado com inóculo.

A técnica de perfuração de poços em meio de cultura Mueller Hinton é realizada com o auxílio de uma forma cilíndrica de 6 mm de diâmetro. Os

poços são preenchidos com 50 µL da substância que se quer avaliar. Após a incubação, os halos de inibição são medidos com paquímetro (SILVEIRA *et al.*, 2009).

O método de macrodiluição em um meio líquido cuja a finalidade é determinar a concentração mais baixa do antimicrobiano, que é capaz de inibir a multiplicação da bactéria analisada, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM). Este método é reprodutível e fácil de quantificar em relação ao método de difusão em meio sólido e pode ser realizado em tubos com volume de no mínimo de 2 mL.

Os objetivos do trabalho foram:

a). Avaliar a atividade antibacteriana de cinco compostos de quaternário de amônio: cloreto de alquilbenzil dimetilamônio (BAC), cloreto de metiltrialquilamônio (CMTA), cloreto benzildimetil amônio (CBDMA), metil dodecil benzil trimetil cloreto de amônio (CMBTA) e de (BAC+ ETB), pelo método de difusão em meio sólido, frente *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*.

b). Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos cinco compostos de quaternário de amônio da alínea a), pelo método de macrodiluição, frente *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2. Tensoativos de quaternário de amônio

Os tensoativos de quaternário de amônio avaliados foram: cloreto de alquilbenzil dimetilamônio (BAC); cloreto de metiltrialquilamônio (CMTA); cloreto de benzildimetil dodecil etil amônio (CBDMA); cloreto de metil dodecilbenzil trimetil amônio (CMDA) e o formulado comercial (BAC + ETB).

2.3. Micro-organismos

Foram utilizadas estirpes de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 23109 mantidas no Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos (LHMA), do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As cepas de fungos utilizadas foram *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*, cedidas pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

2.4. Difusão em meio sólido para bactérias

A atividade antibacteriana dos tensoativos de quaternário amônio foi avaliada pelo método de difusão em disco, conforme *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2003) com modificações (perfuração em ágar), e o método de macrodiluição em tubos, segundo a normativa M7-A6 CLSI (2003).

2.4.1. Preparação do inóculo das bactérias

Foram utilizadas cepas bacterianas congeladas, ativadas por duas vezes em caldo (*Brain Heart Infusion*) BHI e incubadas a 35 °C por 24 h, em sistema estático. A partir deste inóculo foram feitas estrias em meio de cultivo específico para cada bactéria e incubadas a 35 °C, por 24 horas, deste meio agar foram selecionadas pelo menos três colônias bem isoladas do mesmo tipo morfológico. Com uma alça as superfícies destas colônias foram tocadas e transferidas a um tubo contendo 10 mL de BHI.

Preparado da forma descrita, no parágrafo anterior um volume de 30 mL de suspensão de células bacterianas foi centrifugado a 2200 g, durante 10 min, o volume do sobrenadante descartado, e o precipitado ressuspensionado em 30 mL de solução salina 0,85 % (m/v). Este procedimento foi repetido por três vezes.

A suspensão microbiana obtida foi ajustada a uma turbidez ótica comparável à solução padrão 0,5 de McFarland, medida em um espectrofotômetro, calibrado a um comprimento de onda de 625 nm. A medida

da absorvância apresentou valores na faixa de 0,08 a 0,10(CLSI, 2003),correspondiente a uma suspensão de células contendo 1 a 2×10^8 UFC/mL. As suspensões das células de *S. Enteritidis* e *S. aureus* foram espalhadas com o auxílio de swabs em placas petri contendo ágar Mueller-Hinton.

Cinco poços de 6 mm de diâmetro perfurados no meio ágar Mueller-Hinton. Em cada poço, alíquotas 50 µL de tensoativo foram adicionados para as concentrações a serem avaliadas: BAC (4 a 0,008 mg/ mL), para CMTA (0,1 a 0,00021mg/mL), para (BAC+ETB) entre (100 a 0,19 mg/mL), para CBDMA entre (30 mg/mL a 0,05mg/mL) e para CMDA (0,66 mg/L a 0,001)

As placas de petri foram mantidas por 2 h, à temperatura de refrigeração (10 °C), para permitir a difusão do tensoativo no meio sólido. Em seguida, as placas de petri foram incubadas a 35 °C, durante 24 h e os diâmetros dos halos de inibição medidos com auxílio de uma lupa e régua, e expressos em mm. Como controle positivo foi utilizado cloranfenicol (30 µg) e como controle negativo a água esterilizada. Cada tensoativo foi avaliado em quatro repetições, e o experimento foi realizado em triplicata.

2.5. Método de difusão em meio sólido para fungos.

Penicillium expansum, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea* foram cultivados em tubos contendo *Batata Dextrose Agar* (BDA) (HI MEDIA) acidificado com ácido tartárico ao 10%, incubados a 25 °C, por 7 dias para induzir a esporulação. Após incubação, os micélios e esporos foram coletados com uma alça plástica descartável, em aproximadamente, 10 mL de água destilada esterilizada. A suspensão foi filtrada em gaze esterilizada.

Esta suspensão filtrada foi agitada com auxílio de um vortex por 15 s, utilizando solução salina 0,9 % esterilizada para diluir, até alcançar a turbidez de uma solução padrão de McFarland de 0,5. A turbidez foi medida com espectrofotômetro calibrado a um comprimento de onda de 530 nm. A absorvância varia entre 0,09 e 0,11, correspondente a uma concentração de $0,5$ a 4×10^6 esporos/mL para *penicillum* sp.(MALDONADO *et al.*, 2005).

Em placas de petri esterilizadas foi colocado 1 mL da suspensão de esporos, em seguida foram vertidos 30 mL de *Agar Sabouraud Dextrose*(ASD) fundido e resfriado entre 45°C a 50 °C.(MALDONADO *et al.*, 2005).Após solidificado o ágar, poços de 6 mm de diâmetro foram perfurados e preenchidos com 50 µL das soluções de quaternário amônio em diluições apropriadas. As placas foram incubadas por 48 h a 25 °C.(ROJAS *et al.*,2005;OSTROSKY, *et al.*, 2008). A concentração do tensoativo capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento dos fungos maior ou igual a 10 mm de diâmetro foi considerada como a CIM (OSTROSKY, *et al.*, 2008).

2.6. Método de macrodiluição em tubos, determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Diluições seriadas de cada tensoativo foram volumetricamente preparadas em caldo Mueller-Hinton. Para cada série, foram utilizados 10 tubos de ensaio esterilizados com tampa de rosca. O primeiro tubo continha 2 mL da concentração inicial do antimicrobiano. E cada um dos seguintes tubos da série continham 1 mL de caldo Mueller Hinton. Com uma pipeta estéril foi transferido 1 mL de tensoativo (antimicrobiano) do primeiro tubo ao segundo se mistura a diluição, e com outra pipeta estéril se transfere 1 mL ao terceiro tubo, e assim por diante até chegar ao último tubo do qual se descarta 1 mL da diluição. Se completa a série com um tubo que contem 1 mL de caldo Mueller Hinton, sem antimicrobiano e que servira como controle de multiplicação bacteriana.

Uma suspensão bacteriana com concentração de 1×10^8 UFC/mL é preparada e a sua concentração ajustada pela medida da absorbância. Esta suspensão é diluída com solução salina até 1×10^4 UFC/ mL, o que constitui o inóculo bacteriano com a concentração ajustada. Agregar a cada tubo da série 1mL deste inóculo, (CLSI, 2003).

Os tubos foram inoculados foram incubados a 35 °C, durante 16 a 20 h a CIM foi a menor concentração de agente antimicrobiano que inibiu completamente a multiplicação do micro-organismo no tubo, conforme observação visual, tendo como referência o tubo controle sem a substânciaantimicrobiana (CLSI, 2003).

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. O experimento constou de cinco tratamentos, cada um com quatro repetições, cada repetição em triplicata, para as duas cepas bacterianas e as três cepas de fungos. Tanto para o teste de macrodiluição em meio líquido tanto como para o teste de difusão em meio sólido.

A análise de variância dos resultados do teste de difusão em meio sólido, foi realizado empregando o software Minitab versão 17 e as medias das medidas dos halos comparadas por meio do teste Tukey $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da atividade antimicrobiana dos tensoativos de amônio quaternário

4.1.1. Ação bactericida no teste de difusão em meio sólido

Na Tabela 1 estão mostrados os resultados para atividade antimicrobiana de cinco compostos de quaternário de amônio sobre *Staphylococcus aureus* *Salmonella* Enteritidis, avaliados por meio do teste de difusão em meio sólido. A ordem decrescente da atividade bactericida destes compostos para *S. aureus* foi: CMDA=BAC=(BAC+EBT)>CBDMA ($P<0,05$) e para *S. Enteritidis*, CMDA>BAC>BAC+ETB=CBDMA. O cloreto de cetil trietil amônio (CMTA) não apresentou atividade bactericida, nas concentrações aplicadas, para nenhuma das estirpes bacterianas.

A atividade bactericida CMDA, foi igual ($P<0,05$) à do cloranfenicol utilizado como controle positivo, pelo que poderia ser considerado um bom bactericida nas concentrações utilizadas, para as duas cepas de bactérias avaliadas nas condições do teste.

A falta de formação de halo com o CMTA, não expressa necessariamente, a ausência de atividade bactericida, frente a *S. aureus* e *S.*

Enteritidis, isto pode dever-se a uma menor velocidade de difusão da molécula, por ser esta uma molécula apolar (MORENO *et al.*, 2006). Esta característica do composto poderia diminuir a probabilidade de que a molécula entrasse em contato com a superfície bacteriana.

Tabela 1 Diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) do crescimento bacteriano referentes a cada um dos cinco composto de quaternário de amônio avaliados contra *S. aureus* e *S. Enteritidis*.

Tensoativos	Bactérias			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella</i> Enteritidis	
	Concentração (mg/mL)	Diâmetro halo de inibição (mm)	Concentração (mg/mL)	Diâmetro halo de inibição (mm)
Cloreto de benzalcônio	4,0	18,2 ± 1,8 bc	2,0	18,0 ± 1,4 b
(BAC +ETB)	50,0	15,0 ± 3,4 bc	100,0	14,7 ± 0,9 c
Cloreto de cetiltriethylamônio (CMTA)	0,1	6,0 ± 0,0 d	0,1	6,0± 0,0 d
Cloreto de metildodecilbencil (2-dodecil oxietil) amônio (CBDMA)	15,4	13,7 ± 2,0 c	7,0	14,0 ±1,6 c
Cloreto de Metildodeciltrimetil amônio (CMDA)	0,6	19,2 ± 2,2 ab	0,6	22,7±1,5 a
Controle positivo Cloranfenicol	30 µg/mL	23,2 ± 1,5 a	30 µg	20,3 ± 0,5 a
Controle negativo H ₂ O	-	6,0 ± 0,0 d	-	6,0 ± 0,0 d

Medias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Diâmetro = 6,0 mm corresponde à concentração sem formação de halo.

Na Tabela 2 se apresentam os valores para a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano, para cada um dos compostos de quaternário de amônio avaliados por meio do teste de difusão em meio sólido. De entre os

cinco tensoativos CMDA e BAC apresentaram maior atividade bactericida para *S. Enteritidis*, e para *S.aureus*.

Pelos valores da Tabela 2, constatou-se que por meio deste teste, *S. Enteritidis* foi mais resistente do que *S. aureus* à ação bactericida dos compostos de quaternário de amônio avaliados. A menor susceptibilidade desse micro-organismo aos compostos de quaternário de amônio poderia estar relacionada à presença da membrana externa, de natureza lipoproteica, que age como barreira, limitadora da entrada dos CAQs.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) de tensoativos de quaternário de amônio, pelo método de difusão em meio sólido para *S.aureus* e *S. Enteritidis*.

Tensoativos	Concentração Inibitória Mínima (CIM) mg/mL	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
Cloreto de benzalcônio	0,06	0,12
(BAC + ETB)	3,12	6,25
Cloreto de cetiltriethylamônio (CMTA)	nd	nd
Metildodecylbencil(2-dodecyl oxietil) cloreto de amônio (CBDMA)	0,50	0,90
Metil dodecil trimetil cloreto de amônio. (CMDA)	0,05	0,10

Dados obtidos de quatro repetições com triplicas por repetição. (nd) não determinado na faixa de concentração avaliado

Os valores determinados da CIM, para cloreto de benzalcônio, são maiores para *S. Enteritidis* (0,12 mg/mL) que para *S. aureus* (0,06 mg/mL). Esta mesma tendência foi relatada por Garção (2013), que determinou a CIM para o BAC sobre as mesmas estirpes bacterianas, encontrando valores de 0,5 mg/L para *S. aureus* e 16 mg/L para *S. Enteritidis*.

Na figura 1 estão mostrados os halos de inibição sobre *S. Enteritidis* de cinco diluições 1:2 preparadas a partir da maior concentração (1) para cada um dos compostos 100 mg/mL de BAC+ETB e 4 mg/mL de BAC respectivamente.

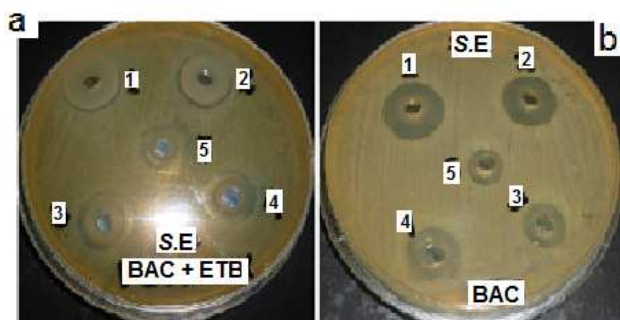


Figura 1. Halos de inibição do crescimento de *Salmonella Enteritidis* *in vitro* pela ação de tensoativos a) BAC+EBT e b) cloreto de benzalcônio (BAC)

Valores da CIM para *S.aureus* frente a compostos de quaternário de amônio encontrados na literatura, diferem dos determinados em nosso trabalho, por exemplo, para o BAC sobre *S. aureus* a CIM reportada por Miyagui *et al.* (2000) foi de 0,001 mg/mL, valor próximo a 0,002 mg/mL, encontrado por FURI *et al.* (2013). Entre tanto valores maiores foram reportados por pesquisadores como HOUARI e DI MARTINO, (2007) com valor de 0,008 mg/mL e Cabrera *et al.* (2007) com um valor de 0,5 mg/mL.

Estas diferenças podem dever-se a múltiplos fatores como ser: diferença entre sorovares da estirpe utilizada; sorovares resistentes; caldo nutriente utilizado na multiplicação dos micro-organismos e o tipo de teste de sensibilidade antimicrobiano utilizado para a determinação da CIM.

Diferenças no valor da CIM, em função do tipo de teste utilizado na avaliação da mesma estirpe bacteriana foram relatados por STUPAR *et al.* (2014)

4.2. Ação bactericida pelo teste de macrodiluição

No teste de macrodiluição, foi determinada a menor diluição que ainda apresenta eficiência bactericida. A sequência de eficiência considerando-se os

valores de CIM foram BAC>CMDA>CBDMA>CMTA>BAC+EBT, tanto para *S. Enteritidis* quanto para *S. aureus* (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) de tensoativos de quaternário de amônio, pelo método de macrodiluição para *S.aureus* e *S. Enteritidis*.

Tensoativos	Concentração Inibitória Mínima (CIM) mg/mL	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
Cloreto de benzalcônio (BAC)	0,03	0,03
Cloreto de cetiltriethylamônio (CMTA)	2,50	2,50
Cloreto de benzalcônio + etilbenzalconio (BAC +ETB)	3,12	3,12
Metildodecilbencil(2-dodecil oxietil) cloreto de amônio (CBDMA)	0,90	0,90
Metil dodecil trimetil cloreto de amônio. (CMDA)	0,10	0,10

Dados obtidos de quatro repetições com triplicas cada repetição.

A pesar das diferenças características entre as estirpes bacterianas avaliadas, a Tabela 3 apresenta valores iguais para a CIM dos compostos de quaternário de amônio avaliados, pelo teste de macrodiluição.

4.3. Comparação entre os testes de difusão em meio sólido e macrodiluição

Comparando os resultados obtidos por meio dos dois testes aplicados para a seleção dos tensoativos, verifica-se três aspectos importantes. Primeiro, constatou-se que os testes indicaram sequências de eficiências bactericidas diferentes. Segundo, o teste de macrodiluição determinou valores de CIM menores do que o teste de difusão em meio sólido para o BAC. Um terceiro aspecto, é o fato de que o teste de difusão indicou que *S. Enteritidis* foi mais

resistente do que *S. aureus*. Bona et al. (2014) encontraram que os valores das CIMs pelo método de macrodiluição foram menores em relação as encontradas pelo método de difusão em meio sólido

Na realidade os fundamentos básicos dos testes são diferentes, embora tenham o mesmo objetivo. No método de difusão em meio sólido, a molécula deve difundir-se através do sólido (ágar), para entrar em contato com a bactéria e o fator de difusão pode influenciar na atividade antimicrobiana dos CAQs. Esse diferencial de difusão pode ser observado quando se avaliou o CMTA que não apresentou atividade bactericida pelo teste de difusão em meio sólido, mas, sim, no teste de macrodiluição (BONA *et al.*, 2014)

A maior atividade bactericida destes compostos no teste de macrodiluição poderia ser explicada pela maior liberdade dos monômeros carregados positivamente para se aderir na superfície das células bacterianas, o que fica facilitado no meio líquido, e em consequência expressar sua atividade antimicrobiana.

Os valores iguais das CIMs tanto para gram positiva como gram negativa no método de macrodiluição, poderiam ser explicados pelas diluições utilizadas 1:2, o que não permite registrar diferenças entre valores intermediários.

4.4. Ação fungicida pelo método de difusão em meio sólido

Na Tabela 4 se apresentam-se os resultados dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento dos fungos *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, e *Botrytis cinerea*, devido à atividade fungicida de cinco compostos de quaternário de amônio, pelo teste de difusão em meio sólido

A ordem decrescente dos diâmetros dos halos de inibição, formados pela atividade fungicida dos compostos de quaternário de amônio, foi: para *Penicillium digitatum* BAC+ETB>CMTA>BAC, para *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* foi: BAC+ETB>BAC.

O formulado comercial BAC+ETB foi o que teve o melhor desempenho para as três cepas de fungos avaliados, seguido do BAC que foi ($p<0,5$) mais

eficiente para *B. cinérea* e *P. expansum*, comparada sua atividade com *Penicillium digitatum*.(Tabela 4).

O cloreto de cetil trietil amônio (CMTA) teve atividade fungicida só para *P. expansum* e não apresentou atividade sobre *P. digitatum* e *Botrytis cinerea*.

Tabela 4 Máximos diâmetros dos halos de inibição do crescimento dos fungos referentes a os compostos de quaternário de amônio.

TENSOATIVOS		Diâmetro dos halos de inibição (mm)			
		Concentração mg/mL	<i>Penicilliumdigitatum</i>	<i>Penicilliumexpansum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Cloreto de benzalcônio	de	4,0	10,3 ± 0,6 b	11,6 ± 0,6 a	16,3 ± 1,1 b
Cloreto de cetiltriethyl amônio CMTA		0,1	11,0 ± 0,0b	6,0 ± 0,0 c	6,00 ± 0,0c
(BAC + ETB)		100	20,6 ± 0,6 a	23,7 ± 0,5 b	24,3 ± 1,5a
Metildodecilbencil(2-dodecil oxietil) cloreto de amônio (CBDMA)		30	6,0 ± 0,0 c	6,0 ± 0,0c	6,0 ± 0,0c
Metil dodecil trimetil cloreto de amônio (CMDA)		0,6	6,0 ± 0,0 c	6,0 ± 0,0c	6,0 ± 0,0c
Controle negativo H ₂ O		-	6,0 ± 0,0 c	6,0 ± 0,0c	6,0 ± 0,0c

Medias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Diâmetro = 6,0 mm corresponde à concentração sem formação de halo.

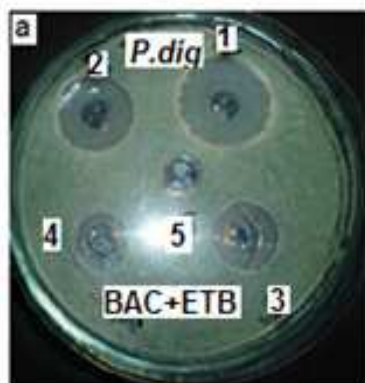


Figura 2. Halos de inibição do crescimento de fungo *in vitro* pela ação de (BAC+EBT): a) *Penicillium digitatum*

As concentrações de inibição mínimas sobre as espécies de fungos filamentosos para as soluções de BAC seguiram a seguinte ordem de resistência: *Penicillium expansum* > *Penicillium digitatum* > *B. cinerea*, Tabela 5, e foram menores comparadas com as do BAC + ETB.

As cepas dos fungos avaliados apresentam susceptibilidade diferenciada e individual, em relação ao mesmo composto biocida, comportamento similar, foi reportado por Levinskaine, (2012) ao estudar a atividade fungicida de cloreto de benzalcônio sobre esporos de três gêneros de *Penicillium*. Os esporos *germinativos* foram inibidos de maneira diferenciada e individual pela atividade antifúngica de cloreto de benzalcônio (LEVINSKAINE, 2012).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) dos tensoativos de quaternário de amônio sobre crescimento fúngico pelo método de difusão em placa

TENSOATIVOS	Concentração inibitória mínima (mg/mL)		
	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Cloreto de benzalcônio	0,25	2,0	0,12
(BAC+ETB)	6,2	12,5	6,2

Os valores das concentrações mínimas de inibição para fungos, observados pelo método de difusão em meio sólido por poço, diferem em valor dos encontrados pelo método de macrodiluição em caldo em aproximadamente um ciclo logarítmico de UFC/g (MAGALDI *et al.*, 2004; MILICE *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÕES

Dos cinco compostos de quaternário de amônio avaliados pelo teste de difusão em meio sólido, os produtos mais eficientes para o controle do crescimento das cepas de *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea* testadas foram: (BAC + ETB) e o BAC. Estes dois compostos apresentaram também atividade bactericida, sendo mais eficientes contra *Staphylococcus aureus* comparado com *Salmonella Enteritidis*. Entre tanto os compostos de quaternário de amônio (CMTA, CBDMA CMDA) não apresentaram atividade fungicida, ainda, que tiveram bom desempenho bactericida para ambas estirpes bacterianas.

Na avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo teste de macrodiluição para os cinco compostos de quaternário de amônio, os valores das CIMs foram iguais entre si, para as duas espécies bacterianas testadas, e menores em valor, comparadas às avaliadas pelo método de difusão em meio sólido, para os compostos BAC e BAC+ETB no último composto só sobre a bactéria gram positiva.

A CIM para ambas estirpes bacterianas, pelo método de macrodiluição foi para: (BAC+ETB) igual a 3,12 mg/mL e para BAC foi de: 0,03 mg/mL.

O teste de difusão em meio sólido e o teste de macrodiluição determinaram valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) diferentes para os compostos de quaternário de amônio e estirpes bacterianas avaliadas, aproximadamente em uma diluição ao 50%.

6. REFERENCIAS

BONA, E. A. M.; PINTO, F.G.S.; FRUET, K.T.; JORGE, M.T.C.; CARVALHO de MOURA, A.; Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos Arq. **Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

BORE E., HEBRAUD M., CHAFSEY I., CHAMBON C., SKJAERET C., MOEN B., MORETRO T., LANGSRUD O., RUDI K., LANGSRUD S. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. **Microbiology**, 153, 935-946. 2007.

CABRERA, C.E.; GÓMEZ, R.F.; ZUÑIGA, A.E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antissépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. **Col.,Med.**, v. 38, 2007.

NCCLS/ CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico, M7-A6.

DALTIN, D., **Tensoativos, química, propriedades e aplicações**, Ed. Blucher A., 2011.

FURI, L.; CIUSA, M.L.; KNIGHT, D.; DI LORENZO, V.; TOCCI, N.; CIRAZOLA D.; ARAGONES, L.; COELHO, J.R.; FREITAS A.T.; MARCHI, E.; MOCE, L. VISA, P.; NORTHWOOD, J.B.; VITI, C.; BORGHI, E.; OREFICI, G. ; MORRISSEY, I.; OGGIONI, M.R.; Evaluation of Reduced Susceptibility to Quaternary Ammonium Compounds and Bisbiguanides in Clinical Isolates and Laboratory-Generated Mutants of *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **American Microbial Society**, 2013.

GILBERT, P.; MOORE, L.E., Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet, **J. Appl. Microbiol.** v. 99, p. 703 – 715, 2005.

GUIQIAN LU, G.; WU, D.; FU, R., Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylamino ethylmethacrylate, **Reactive e Functional Polymers**, v. 67, 355–366, 2007.

HOUARI, A.; DI MARTINO, P.; Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation, Journal compilation, The Society for **Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology** v. 45; p. 652–656; 2007.

LEVINSKAITÉ, L., Susceptibility of food-contaminating *Penicillium* genus fungi to some preservatives and disinfectants. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. vol. 19, No 1. 2012.

MAGALDI, S.; ESSAYAG, M. ; CAPRILLES, C.H.; PEREZ, C.; COLELLA, M.T.; OLAIZOLA, C.; ONTIVEROS, Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **J. Inter, Infect. Dis.**, v.8, p. 39-45, 2004.

MALDONADO, M.C.; RUNCO, R.S.; NAVARRO, A. R. Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non pathogenic fungi. **Rev. Iberoam. Micol.**,v.22, p. 57-59, 2005.

MARTINS, A.N.; SILVEIRA, A. P. DA; FURTADO, E.L. Avaliação do Cloreto de Benzalcônio no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.143-145, 2009.

MIYAGI, F.; TIMENETSKY J., ALTERTHUM F., Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar, **Rev Saúde Pública**, v.34, p.44-48 2000; www.fsp.usp.br/rsp

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **FreeRadical Research**, Buenos Aires, v.40, p.223-231, 2006.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M. E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R., Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Rev Bras. Farmacogn.**v.18, 2008.

ROJAS, J. J.; GARCÍA, A. M.; LOPEZ, A., Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales. **BLCPMA**, v.4, p.28, 2005.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, S.J.; NOGUEIRA da CRUZ A. L.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**,v.90: p. 124-128, 2009.

STUPAR, M.; GRB'Ć, M. LJ.; DZAMIC, A. ; UNKOVIC, N.; RISTIC, M.; JELIKIC, A. ; VUKIJEV, J. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. **South African journal of botany**. v.93, p.118- 119, 2014.

TADROS, T. F., **Applied Surfactant principles and applications**, Wiley BCH, Verlag GmbH & Co. KGaA. 633 p., 2005. ISBN: 3-527-30629-3

CAPITULO 3.

Aspectos termodinâmicos da adesão bacteriana e sanitização de vegetais com tensoativos catiônicos

RESUMO

Os compostos quaternários de amônio são estudados pela sua capacidade de diminuir a tensão interfacial, modificar a hidrofobicidade das superfícies tratadas e particularmente, pela sua atividade bactericida. Nesse sentido, avaliou-se a influência de tensoativos quaternários de amônio nas propriedades termodinâmicas das superfícies vegetais, adesão bacteriana, ação bactericida. A hidrofobicidade das superfícies vegetais foi determinada antes e depois da aplicação dos tensoativos e estimadas as energias livres de hidrofobicidade e da adesão bacteriana. As superfícies vegetais foram tratadas com os tensoativos em dois processos: a) pré-tratamento das superfícies de tomate, maçã e folhas de rúcula por imersão em cloreto de benzalcônio (BAC) nas concentrações 125 e 2000 mg/L, e no formulado à base de cloreto de benzalcônio mais etilbenzalcônio (BAC+ETB) nas concentrações de 6,25 e 100 mg/L, posterior adesão dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis e determinação da quantidade de micro-organismos aderido (UFC/cm²). E b) adesão dos micro-organismos às superfícies vegetais, posterior tratamento com cloreto de benzalcônio (BAC) na concentração de 125 mg/L, e o formulado cloreto de benzalcônio mais etilbenzalcônio (BAC+ETB) na concentração de 6,25 mg/L, e determinação das Reduções Decimais (RD). Todos os tratamentos em ambas etapas foram comparados com a concentração de 200 mg/L de dicloroisocianurato de sódio (DCICNA). O pré-tratamento com os tensoativos alterou a hidrofobicidade das superfícies de frutos de tomate, maçã e folhas de rúcula de hidrofóbicas para hidrofílicas, tornando-as termodinamicamente desfavoráveis para a adesão ($\Delta G_{adesão} > 0$). A adesão em tomate foi desfavorável para *S. Enteritidis* e não para *S. aureus* quando pre-tratadas com 125 mg/L de BAC. O aumento da concentração para 2000 mg/L não alterou o

padrão de resposta em relação aos micro-organismos, e desfavoreceu significativamente a adesão de *S. Enteritidis* em relação à concentração menor de BAC. O pre-tratamento com BAC+ETB foi desfavorável para os dois micro-organismos. Em *S. aureus* a adesão foi menor a concentração de 6250 mg/L comparado com 100 mg/L, e *S. Enteritidis* resultou em menor adesão com 100 mg/L em relação à menor concentração (6,25 mg/L). Em rúcula, a adesão foi desfavorecida para *S. aureus* quando pre- tratadas com BAC nas duas concentrações, sendo menor com a maior concentração. A adesão de *S. Enteritidis* foi dependente da concentração, sendo desfavorecida com a maior concentração. O pre-tratamento com BAC+ETB foi desfavorável para os dois micro-organismos nas concentrações estudadas. A adesão de *S. aureus* foi desfavorável em magnitudes similares em ambas as concentrações, quanto que menores adesões foram obtidas com a maior concentração. A aplicação de 125 mg/L de BAC após a adesão de *S. Enteritidis* resultou em reduções significativas ($P \leq 0,05$) somente para rúcula, em relação ao controle. O formulado BAC +ETB na contração de 6,25 mg/L atingiram valores de de reduções decimais (RD) de 4,8 RD, 6,1 RD, 5,6 RD na superfície de maçã, tomate e rúcula, respectivamente, sendo as reduções significativas ($P \leq 0,05$) em relação aos controles para maca (1,8 RD), tomate (1,9RD) e rúcula (0,9RD). No caso da aplicação de 125 mg/L de BAC após adesão de *S. aureus* atingiram-se reduções de 2,3 RD, 2,0 RD na superfície de maçã e tomate, respectivamente, com diferença significativa ($P \leq 0,05$) somente para maca em relação ao controle (1,9 RD). A aplicação de 6,25 mg/L BAC+ETB, resultou em redução de 3,6RD para maca e 1,0RD para tomate, sendo somente significativa a RD, somente para maca, em relação ao controle de maçã (1,9 RD). Conclui-se que o pré-tratamento com BAC e BAC +ETB modifica a hidrofobicidade das superfícies vegetais de hidrofóbicas a hidrofílicas, para as duas concentrações. Estes tensoativos alteram a energia livre de adesão ($\Delta G_{adesão}$) da superfície do vegetal para menos favoráveis à adesão de *S. aureus*, em função do vegetal e desfavoráveis para *S. Enteritidis*. A magnitude desta alteração é função da concentração do tensoativo para ambos os casos. Entre tanto esta alteração na $\Delta G_{adesão}$ não é significativa para o BAC e isto varia em função da concentraçãoe é significativa para BAC +ETB,

para todas as superfícies vegetais e micro-organismos avaliados, com relação aos resultados do análise microbiológico expressos em UFC/cm²

1. INTRODUÇÃO

Frutas e hortaliças frescas são habitat natural para micro-organismos como bactérias, em geral não são patogênicos para o homem, entretanto cada vez com mais frequência estas são identificadas como veículos de bactérias patogênicas. *Escherichiacoli*, *Salmonella*, e *Listeria* (BEUCHAT *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2007; BERGER *et al.*, 2010; AMIN *et al.*, 2012; LEEF e FIERER, 2013) são as mais comuns. No processo de adesão bacteriana as características físico-químicas como hidrofobicidade da superfície vegetal, e da bactéria, em meio aquoso, facilitam ou inibem a adesão (BASTOS, *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2009; ZHAO, *et al.*, 2014).

Van Loosdrecht *et al.* (1990) explicaram que para ter uma adesão efetiva entre duas superfícies em meio aquoso o filme de água que as separa têm que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies interatuantes contribui para a facilidade de essa remoção. Isto significa que as interfaces bactéria/água e a interface superfície de adesão/água, devem ser substituídas pela interface, bactéria/superfície de adesão. Termodinamicamente a adesão só acontecerá si o sistema diminui a energia livre global, o que lhe conferirá maior estabilidade, para isto os valores de $\Delta G_{adesão}$ devem ser negativos.

As superfícies dos frutos e folhas são hidrofóbicos, devido principalmente à presença de ceras cuticulares (PETIT-JIMÉNEZ *et al.*, 2009). A hidrofobicidade das superfícies pode modificar-se pela presença de soluções que alterem a carga superficial eletrostática das superfícies de vegetais (ZHAO, *et al.*, 2014). Assim, bactérias com hidrofobicidades diferentes se aderem diferencialmente sobre uma mesma superfície. *Salmonella* spp. se adere com maior força que *E. coli*, que por sua vez se adere com mais força que *Listeria* na superfície do melão cantaloupe (UKUKU e FETT, 2002; REINA *et al.*, 2002; WALKER *et al.*, 2005).

A rugosidade da superfície dos vegetais em escala microscópica parece enormes cavernas e vales, onde as bactérias encontram abrigo e proteção física à ação dos sanitizantes. Estas diferenças na topografia da superfície

podem reter entre 10 e 100 bactérias após a sanitização (WANG *et al.*, 2009). Wang (2009), encontrou uma correlação linear negativa entre (Ra) e a inativação de *E. coli* O157:H7 por procedimentos de lavagem e sanitização dos vegetais.

Em razão disto compostos capazes de modificar a tensão superficial e com atividade bactericida e fungicida, como são os compostos de amônio quaternário, constituem alternativas a serem avaliados, na sanitização de frutas e hortaliças, (VELAZQUEZ *etal.*, 2009).

Este trabalho teve como objetivos:

- a) Avaliar a hidrofobicidade das superfícies vegetais de tomate, maçã e rúcula e das superfícies bacterianas de *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* pelo método de ângulo de contato.
- b). Avaliar a hidrofobicidade dos vegetais pré-tratados com compostos quaternário de amônio, através do método do ângulo de contato.
- c). Avaliar mediante as equações da termodinâmica de Young e Laplace, a influência da hidrofobicidade na adesão de *S. Enteritidis* e *S. aureus* sobre as superfícies de tomate, maçã e rúcula.
- d). Avaliar o efeito do pré-tratamento com dicloroisocianurato de sódio, cloreto de benzalcônio, BAC+ETB, na adesão *S. Enteritidis* e *S. aureus* nas superfícies vegetais, visando determinar a influência da modificação da hidrofobicidade das superfícies e avaliar a sua relação com a adesão bacteriana.
- e). Avaliar a eficiência da sanitização com cloreto de benzalcônio (BAC), (BAC+ETB) e dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), na sanitização de tomate, maçã e rúcula, contaminadas com *S. Enteritidis* e *S. aureus* aderidas nas superfícies vegetais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Superfícies vegetais

Frutos de tomate, maçã e as folhas de rúcula sadias, sem qualquer dano físico, foram lavadas com água potável e deixadas para drenar à temperatura de 25 °C por 30 min. Cupons de 20 mm x 20 mm foram cortados das folhas de rúcula e da superfície da maçã e do tomate. Os cupons dos vegetais foram aderidos na superfície de lâminas para microscópio, por meio de uma fita dupla face, para realizar a medida da hidrofobicidade pela técnica do ângulo de contato e pelo método da gota sésil.

2.2. Preparo das soluções sanitizantes

Os sanitizantes utilizados foram dicloroisocianurato de sódio (DCICNA) na concentração de 200 mg/L de cloro residual total (Nippo Clor Nippon®); cloreto de benzalcônio (BAC) a 2000 mg/L e 125 mg/L e a formulação (cloreto de benzalcônio +etilbenzalcônio) a 100 mg/L e 6250mg/L

A solução de dicloroisocianurato de sódio foi preparado em (v/v). As soluções de BAC e BAC+Etilbenzalcônio (BAC+ETB) foram preparadas por diluição a partir de uma solução concentrada até atingir as concentrações propostas.

2.3. Condicionamento das superfícies com tensoativos

As superfícies dos cupons vegetais foram pré-tratadas com tensoativos mantendo-as imersas em soluções de BAC a (125 mg/L e 2000 mg/L); BAC+Etilbenzalcônio (100 mg/mL e 6250 mg/L) e DCICNA (200 mg/L) durante 15 min a 25°C. Após este tempo, foram colocados para drenar à temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) e medidos os ângulos de contato

2.4. Preparo dos micro-organismos

Os micro-organismos foram mantidos congelados a -80 °C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol na relação (80:20). As culturas congeladas foram reativadas em caldo BHI e a 37 °C, por 24 h e, 10 mL de caldo BHI. As

células da terceira ativação foram utilizadas para a medida do ângulo de contato.

2.5. Determinação do ângulo de contato dos micro-organismos; dos tensoativos e das superfícies vegetais condicionadas com tensoativos ou não

2.5.1. Tensoativos

A avaliação das tensões interfaciais foi realizada no goniômetro da marca Easy Drop, Krüss ®, pelo método da gota pendente. Foram determinadas as tensões interfaciais para dois tensoativos. Cada tensoativo foi diluído 50 %, com 10 diluições cada, e suas tensões interfaciais medidas. As medidas foram feitas a cada segundo durante 15 min até o valor da tensão se estabilizar e registrar o valor médio da tensão. A tensão superficial que é calculada ajustando-se à equação de Young-Laplace para o contorno de uma gota pendente determinada por análise de imagem. Neste método, devem ser conhecidos a densidade do líquido e a fase de queda da gota, neste caso o ar.

2.5.2. Micro-organismos

A medida do ângulo de contato dos micro-organismos foi realizada, na superfície de uma camada de células vegetativas, conforme o método descrito por Busscher *et al.*, (1984). Uma suspensão de células vegetativas (30 mL) com uma concentração próxima a 1×10^7 UFC/mL foi centrifugada a 1200 *g* durante 10 min à temperatura de 4 °C.

Uma vez centrifugada a suspensão, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas ressuspendidas com 30 mL de solução salina a 0,9 % e novamente centrifugadas, sendo este procedimento repetido duas vezes. A suspensão de células vegetativas com, aproximadamente 1×10^7 UFC/mL foi diluída, agregando-se 30 mL de água ultrapura. Esta suspensão foi filtrada a pressão negativa através de uma membrana de acetato de celulose com poros

de 0,45 µm de diâmetro. Sobre o filtro se formou uma camada de células bacterianas e para retirar o excesso de umidade, o filtro foi transferido a uma placa petri, contendo meio de cultura PCA e glicerol a 10% (v/v). Após 1 h, se realizaram-se as medidas, do ângulo de contato com água, α-Bromo naftaleno e formamida, sobre *S. Enteritidis* e *S. aureus*. Três repetições foram realizadas para cada líquido com a superfície de cada estirpe bacteriana.

2.5.3. Superfícies vegetais

Para a determinação da hidrofobicidade quantitativa das superfícies sólidas, pelo método da gota sésil, foram medidos os valores dos ângulos de contato entre a superfície sólida e três líquidos de diferente polaridade, água, formamida e α-bromonaftaleno, cujos componentes de tensão interfacial são conhecidos (Tabela 1)

Tabela 1. Componentes das tensões interfaciais das substâncias a 25 °C.

Substâncias	Tensão Interfacial (mJ/m ²)			
	γ_L^{TOT}	γ_L^{LW}	γ_L^+	γ_L^-
α-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

Os valores da tensão interfacial das superfícies nas condições avaliadas foram determinadas pela substituição dos valores dos ângulos de contato entre a superfície e cada um dos líquidos na equação (2) obtendo-se um sistema de três equações, com três incógnitas em que as soluções de este sistema de equações são os componentes procurados da tensão superficial do sólido.

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + 2 \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+} + 2 \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} \quad (2)$$

Em que: γ_L^{LW} e γ_S^{LW} são a componente apolar da tensão superficial do líquido, e o sólido submerso respectivamente. E γ_s^+ e γ_L^+ representam os componentes polares (receptores de electrons) e γ_s^- : γ_L^- (doadores de electrons) da tensão superficial do líquido e sólido respetivamente.

A energia livre de interação hidrofóbica ΔG_{sas}^{TOT} entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (a) é calculada pelo somatório das componentes apolar (ΔG_{sas}^{LW}) e polar (ΔG_{sas}^{AB}) da energia livre de interação expressada na equação (3).

$$\Delta G_{sas}^{TOT} = \Delta G_{sas}^{LW} + \Delta G_{sas}^{AB} \quad (3)$$

Os fatores do segundo membro da equação (3) foram determinados a partir das equações (4) e (5).

$$\Delta G_{sas}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_a^{LW}} \quad (4)$$

$$\Delta G_{sas}^{AB} = 4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_s^-}\right) \quad (5)$$

A partir dos dados dos ângulos de contato e utilizando-se as equações propostas por van Oss (1995) foi determinada a energia livre de hidrofobicidade das células bacterianas por meio da equação (3). Com os valores das componentes da tensão interfacial é possível determinar a energia livre de adesão $\Delta G_{adesão}$ entre as duas superfícies: célula microbiana (b) e superfícies das amostras (s):

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (6)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW} \gamma_s^{LW}} \quad (7)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2 \left(\sqrt{\gamma_b^+ \gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^- \gamma_s^+} \right) \quad (8)$$

Nas equações 6, 7 e 8, γ_{bs} são as tensões interfaciais entre as superfícies bactéria / superfície de adesão; γ_{bs}^{LW} é a componente apolar, ou interação de-Lifshitz-van der Waals entre bactéria e superfície de adesão; e γ_s^{AB} é componente polar entre a bactéria e superfície.

As equações (6, 7 e 8) podem ser utilizadas para o cálculo da tensão interfacial entre as superfícies bactéria\líquido (γ_{bl}) e de tensão interfacial entre a superfície de adesão \ líquido (γ_{sl}).

A energia livre deve estar diretamente relacionada à tensão interfacial, $\Delta G_{adesão}$ pode ser determinada da seguinte forma:

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (9)$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (10)$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (11)$$

En função do valor obtido por medio da equação (9) para $\Delta G_{adesão}$ pode-se avaliar por meio de equações da termodinamica, se o processo de adesão será favoravel ($\Delta G_{adesão} < 0$) ou desfavoravel se ($\Delta G_{adesão} > 0$).

2.6. Adesão de micro-organismos em superfícies vegetais condicionadas com tensoativos

Frutos de maçã e tomate e folhas de rúcula preparados conforme o item 2.3 foram usadas nesse experimento. *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. aureus* ATCC 23109 mantidas à temperatura de -80 °C, ativadas para cada uso, por meio de duas repicagens consecutivas em BHI e incubada a 37 °C, por 24 h até atingir a concentrações de 10^7 e 10^8 UFC/mL. Após duas ativações às células foram centrifugadas durante 10 min, a 2200g, e lavadas por duas

vezes com solução salina 0,9 % (m/v). As células ressuspensas em solução salina foram utilizadas na inoculação das amostras.

O material vegetal foi colocado em contato com uma suspensão de células de *S. Enteritidis* ATCC 13076 ou *S. aureus* ATCC 23109 de 10^6 UFC/mL durante 12 h a 25 ± 1 °C. As amostras foram drenadas por 15 min. Em seguida, colocadas em sacos de polietileno previamente esterilizados. As amostras preparadas desta maneira foram incubadas a 25 °C, por 2 h para promover a adesão das bactérias nas superfícies das maçãs, tomates e rúcula.

Uma vez aderidas as bactérias sobre as superfícies vegetais foram retirados das mesmas cinco cupons de 2×2 cm² com auxílio de um bisturi esterilizado. Os cupons foram transferidos para tubos Falcon, contendo 30 mL de água destilada esterilizada após 1 min de contato os 30 mL de água os cupons foram retirados com pinça e transferidos em 10 mL de água peptonada 0,1 (m/v) %, em seguida submetidos à agitação, com o auxílio de um vortex durante 2 min. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi retirada para preparar as diluições decimais adequadas que foram plaqueadas em superfície de ágar Hecktoen (Hi Media®), para *S. Enteritidis* e Baird-Parker com suplemento de gema de ovo com telurito de potássio, para a formação da colônia típica de *S. aureus*. Após, as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e 35 °C, respectivamente. Os resultados foram expressos em UFC/cm².

2.7. Sanitização das superfícies de maçã, tomate, e rúcula contaminadas com *S. Enteritidis* e com *S. aureus*

As superfícies de maçã, tomate e rúcula foram intencionalmente contaminadas e aderidas com uma suspensão de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. aureus* ATCC 23109, conforme descrito no item 2.6. Cupons de 20 mm x 20 mm retirados assepticamente foram colocadas em contato por 10 min com soluções de surfactantes, preparados conforme item 2.2., com o controle positivo (dicloroisocianurato de sódio, 200 mg/L) e com o negativo, água destilada esterilizada a 25 °C. As contagens bacterianas na superfície foram feitas a partir das diluições decimais adequadas que foram plaqueadas em

superfície de ágar Hecktoen (Hi Media®), para *S. Enteritidis* e Baird-Parker com suplemento de gema de ovo com telurito de potássio, para a formação da colônia típica de *S. aureus*. Após, as placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C para *S. Enteritidis* e a 35 °C para *S. aureus*. Os resultados foram expressos em log UFC/cm².

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado sendo 3 tratamentos (dicloroisocianurato de sódio a 200 mg/L; cloreto de benzalcônio, formulado comercial (BAC+ETB)) mais um tratamento controle água, aplicados sobre três superfícies diferentes (tomate, maçã e rúcula) sendo realizados para cada tratamento 9 repetições com duplicata, para cada bactéria utilizada (*S. Enteritidis* e *S. aureus*). A unidade experimental submetida a cada tratamento consistiu em 3 tomates tipo italiano, 3 maçãs e 5 folhas de rúcula.

Os valores de hidrofobicidade das superfícies sem tratamento e com pré-tratamento, com os sanitizantes sobre tomate, maçã e rúcula, e a tensão interfacial dos sanitizantes, foram obtidos a partir de 4 repetições com triplicata e calculadas as medias aritméticas e o desvio padrão dessas medias.

Os dados foram analisados com auxílio do software minitab versão 17; e submetidos a análise de variância (ANOVA) para as medias dos logaritmos de (UFC/cm²), nos experimentos de adesão e sanitização das superfícies de tomate, maçã e rúcula, e comparados pelo teste de Tukey a (P<0,05).

4. RESULTADOS E DISCUSÃO

4.1. Modificação da hidrofobicidade das superfícies vegetais pelo pré-tratamento com tensoativos

Na Tabela 2 se apresentam os valores da tensão interfacial do BAC e do BAC+ETB, partindo da solução madre e diluições 1:2. Para as concentrações

utilizadas no condicionamento das superfícies vegetais, as tensões interfaciais foram de 55,3 mJ/m², para o BAC, e de 32,82 mJ/m², para o (BAC+ETB) (Tabela 2). Para o BAC, concentração inicial correspondeu ao menor valor de tensão interfacial e quanto maior a diluição os valores da tensão se aproximaram dos valores da tensão da água pura (72 mJ/m²). Para o (BAC+ETB), as tensões interfaciais se mantiveram com poucas variações, entre 31,0mJ/m² e 35,68 mJ/m² para a faixa de concentrações medidas. As tensões interfaciais encontradas são similares as reportadas por GEORGI *et al.*, (2011) para concentrações diluídas até 0,01 %.

A menor tensão interfacial do (BAC+ETB), comparada com a tensão interfacial do BAC, poderia influenciar na atividade bactericida, do primeiro facilitando o contato entre a superfície bacteriana e a solução sanitizante, (VELAZQUEZ, *et al.*; 2009).

Tabela 2. Tensões interfaciais dos sanitizantes cloreto de benzalcônio (BAC) e a formulação (BAC+ETB) utilizados no condicionamento das superfícies de tomate, maçã e rúcula em diversas diluições.

Cloreto de benzalcônio (BAC)		Cloreto de benzalcônio +etilbenzalcônio (BAC+ ETB)	
Concentração (mg/mL)	Tensão interfacial (mJ/m ²)	Concentração (mg/mL)	Tensão interfacial (mJ/m ²)
4,0	31,92	100	31,16
2,0	32,58	50	31,58
1,0	38,33	25	26,01
0,5	47,58	12,5	31,57
0,25	55,30	6,25	32,82
0,12	58,54	3,12	31,16
0,62	61,82	1,51	32,16
0,31	66,07	0,80	33,62
0,15	68,29	0,40	34,83
0,78	68,44	0,20	35,68

Os valores representam as medias das tensões interfaciais de 5 repetições para cada concentração.

As medidas dos ângulos de contato com três líquidos diferentes, para as superfícies de tomate, rúcula e maçã são apresentadas na (Tabela 3). Os

ângulos de contato entre a água e as superfícies dos vegetais foram maiores que 65 °, pelo que se pode indicar, de maneira qualitativa, que as três superfícies são hidrofóbicas (VOGLER, 1998; VALCARCE *et al.*, 2002).

Tabela 3. Ângulo de contato entre a superfície vegetal e a água, formamida e alfa-bromo naftaleno

Superfície Vegetal	Água (°)	Formamida(°)	α-Bromonaftaleno (°)
Tomate	72,2 ± 0,9	51,0 ± 1,3	45,1 ± 2,5
Rúcula	92,4 ± 1,4	69,1 ± 1,0	50,9 ± 1,4
Maçã	84,5 ± 1,0	54,5 ± 0,7	47,0 ± 2,0

Os valores representam as médias e o erro padrão. N=35

Na Tabela 3, as superfícies de maçã e tomate foram indicadas como hidrofóbicas, para maçã o ângulo de contato foi de 84,5° e para tomate, 72,2° estes valores são próximos a os encontrados na literatura. Assim para a superfície da maçã, Wang *et al.* (2009), reportaram o valor de 77,27°, e para a superfície de tomate os valores foram de 69,3°, (BRILHANTE *et al.*, 2013) e de 79,9°, (FERNANDEZ *et al.*, 2014) para tomate cereja. Estas pequenas variações entre os valores de hidrofobicidade do tomate, provavelmente sejam explicadas pela diferentes composições químicas das ceras cuticulares que variam entre as espécies e entre os cultivares de uma mesma espécie e também o estágio de amadurecimento do tomate (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Os resultados apresentados na Tabela 4, se referem à energia livre de hidrofobicidade calculada por meio das equações, propostas por Young e Laplace. Todos os valores calculados foram negativos, $\Delta G_{SA}^{TOT} < 0$ para as três superfícies vegetais avaliadas, o que indica que estas superfícies são hidrofóbicas (OLIVEIRA, *et al.*, 2007). Estes resultados corroboram a determinação qualitativa realizada através dos valores dos ângulos de contato e a água, para as superfícies vegetais.

Tabela 4. Componentes polares e apolares da energia a total de interação das superfícies vegetais

Superfície Vegetal	ΔG_{SAS}^{LW}	ΔG_{SAS}^{AB}	ΔG_{SAS}^{TOT}
Tomate	-6,48	-31,02	- 38,40
Rúcula	-5,55	-66,84	-72,39
Maçã	-6,19	-54,40	- 60,61

A superfície mais hidrofóbica foi da rúcula, seguida das superfícies da maçã e do tomate, este ordem de hidrofobicidade, foi similar ao determinado pelo método qualitativo proposto por Vogler (1998), para as mesmas superfícies. A hidrofobicidade na superfície dos vegetais é devida à presença de ceras cuticulares, formadas principalmente de cutina, suberina e misturas de longas cadeias de hidrocarbonetos, ácidos graxos, alcanos, com forte caráter hidrofóbico (TAFOLLA-ARELLANO *et al.*, 2013).

Bianchi (1995), estudando a composição química da cutícula isolada, confirmo que a composição química difere entre as espécies vegetais, e em uma mesma espécie, varia por fatores genéticos e ambientais, (KOCH *et al.*, 2006).

A hidrofobicidade das cepas bacterianas foram medidas pelo método do ângulo de contato. Na Tabela 5, são apresentados os ângulos de contato entre os líquidos e as superfícies de cada uma, das estirpes bacterianas. Segundo Vogler (1998), se o valor do ângulo de contato com água, é menor a 65°, a superfície é indicada como sendo hidrofílica. Utilizando este conceito qualitativo, classificamos as duas estirpes bacterianas como hidrofílicas.

Tabela 5. Ângulo de contato entre a superfície das bactérias *S. Enteritidis* e *S. aureus* e a água, formamida e alfa-bromo naftaleno.

Superfície do Micro-organismo	Água (°)	Formamida(°)	Alfa-Bromonaftaleno (°)
----------------------------------	----------	--------------	-------------------------

<i>S. aureus</i>	38,1 ± 1,4	45,3 ± 1,2	40,9 ± 1,7
<i>S. Enteritidis</i>	16,7 ± 0,2	23,5 ± 0,2	41,0 ± 2,1

Os valores representam as medias e o erro padrão.

O valor encontrado para o ângulo de contato entre a água e *S. Enteritidis* foi de 16,7°, valor que está próximo à faixa dos valores relatados na literatura 9,7° a 14° (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e 15,62°, (BRILHANTE, *et al.*, 2013).

Para *S. aureus*, o ângulo de contato foi de 38,1°, (Tabela 5), este valor está um pouco acima dos encontrados na literatura que variam desde 20° a 36° (BRUINSMA, *et al.*, 2001). No entanto, sabe-se que variações na hidrofobicidade das bactérias podem ser induzidas pelo meio de multiplicação utilizado e principalmente pela estirpe bacteriana (DAS e KAPOOR, 2001).

Na Tabela 6, se apresentam os valores de energia livre de hidrofobicidade ΔG_{SAS}^{TOT} , para as duas cepas bacterianas. Sendo que os valores positivos ($\Delta G_{SAS}^{TOT} > 0$), indicam que as superfícies das duas cepas bacterianas foram hidrofílicas, (OLIVEIRA, *et al.*, 2007). Em que *S. aureus* foi mais hidrofílica que *S. Enteritidis* (Tabela 6). Este resultado confirma, a hidrofílicidade das duas cepas bacterianas, determinadas previamente, através do conceito qualitativo, segundo, Vogler (1998).

Tabela 6. Componentes polares ΔG_{SAS}^{AB} e apolares ΔG_{SAS}^{LW} da energia a energia total de interação hidrofóbica das cepas bacterianas

Superfície do Micro-organismo	ΔG_{SAS}^{LW}	ΔG_{SAS}^{AB}	ΔG_{SAS}^{TOT}
<i>S. aureus</i>	-7,05	39,40	32,35
<i>S. Enteritidis</i>	-7,04	36,23	29,46

Na Tabela 7, estão mostrados os valores da variação de energia livre de interação hidrofóbica para as superfícies de tomate, maçã e rúcula, pré-tratadas com soluções de BAC, BAC+ETB e DCICNA.

Sem pré-tratamento o valor da energia livre de interação hidrofóbica total ΔG_{SAS}^{TOT} da superfície de tomate foi de -38,40 mJ/m² considerada hidrofóbica. Quando a superfície do tomate é submetida ao pré-tratamento com solução de DCICNA a energia de interação hidrofóbica, foi de -4,13 mJ/m² e com solução de BAC+ETB (6250 mg/L) foi de: -28,61 mJ/m² tornando, a superfície da rúcula pré-tratada, menos hidrofóbica.

A superfície da rúcula sofre alterações que a tornam, hidrofílica 36,08 mJ/m² quando pré-tratada com solução de BAC (2000 mg/L) e com solução de BAC+ETB (100 mg/mL), a superfície também é alterada para hidrofílica, 53,29 mJ/m², como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Variação da energia de hidrofobicidade para a superfície de tomate, maçã e rúcula pré-tratados com tensoativos, calculadas a partir dos ângulos de contato medidos com os líquidos, água, formamida e alfa-bromonaftaleno

Energia Livre de interação hidrofóbica (mJ / m ²)			
Tensoativos aplicados	Tomate		
	ΔG_{SAS}^{LW}	ΔG_{SAS}^{AB}	ΔG_{SAS}^{TOT}
Água	-6,48	-31,02	- 38,40
Dicloroisocianurato de Sódio	-5,07	0,93	-4,13
Cloreto de benzalcônio(2000mg/L)	- 8,15	44,23	36,08
Cloreto de benzalcônio(125mg/L)	- 4,14	35,45	31,32
BAC+ETB (100 mg/mL)	-9,03	62,33	53,29
BAC+ETB (6250 mg/L)	-8,31	-20,29	-28,61
Rúcula			
Água	-5,55	-66,84	-72,39
Dicloroisocianurato de Sódio	- 6,55	- 13,98	-20,52
BAC (2000 mg/L)	70,1	-5,28	64,83
BAC (125 mg/L)	7,58	1,62	-5,96
BAC+ETB (100 mg/mL)	- 7,05	39,26	32,22
BAC+ETB (6250 mg/mL) `	- 7,58	46,16	38,58
Maçã			
Água	-6,19	-54,40	-60,61
Dicloroisocianurato de Sódio	-3,36	47,02	43,66
BAC (2000 mg/L)	-3,36	58,09	54,73

BAC (125 mg/L)	-3,36	3,05	-0,32
BAC+ETB (100 mg/mL)	-3,36	-36,59	-39,95
BAC+ETB (6250 mg/L)	-3,36	36,73	33,36

Os valores representam as medias de três repetições.

O valor da energia de interação hidrofóbica total ΔG_{SAS}^{TOT} para a superfície de rúcula sem pré-tratamento foi de $-72,39 \text{ mJ/m}^2$ considerada hidrofóbica, após o pré-tratamento com solução DCICNA o valor foi para: $-20,52 \text{ mJ/m}^2$ e quando pré-tratada com solução de BAC (125 mg/L) o valor foi de: $-5,96 \text{ mJ/m}^2$, em ambos casos o pré-tratamento diminui-o a hidrofobicidade das superfícies.

O pré-tratamento pode alterar a hidrofobicidade das superfícies por exemplo: a superfície da rúcula foi alterada de hidrofóbica para hidrofílica ($64,83 \text{ mJ/m}^2$) quando pré-tratada com solução de BAC (2000 mg/L), e para ($32,22 \text{ mJ/m}^2$) também hidrofílica com solução de BAC+ETB (100 mg/mL) como apresentado na Tabela 7.

A superfície da maçã sem pré-tratamento apresenta uma energia de interação hidrofóbica total (ΔG_{SAS}^{TOT}), $= -60,61 \text{ mJ/m}^2$ considerada hidrofóbica. A superfície da maçã com pré-tratamento individual, com soluções de BAC (125 mg/L) e BAC+ETB (100 mg/mL), altera o valor de ΔG_{SAS}^{TOT} da superfície de maçã, para $\Delta G_{SAS}^{TOT} = -0,32 \text{ mJ/m}^2$ e $\Delta G_{SAS}^{TOT} = -39,95 \text{ mJ/m}^2$ respectivamente, sendo ambas menos hidrofóbicas que a superfície sem tratamento, pelo que se pode inferir que os tensoativos catiônicos alteram a hidrofobicidade das superfícies, umas vezes diminuindo a hidrofobicidade e em alguns casos aumentado a mesma. Este comportamento está influenciado pela concentração do tensoativo.

Pré-tratadas com soluções de DCICNA, BAC (2000 mg/L) e BAC+ETB (6250 mg/L), a ΔG_{SAS}^{TOT} das superfícies de maçã foram alteradas de hidrofóbicas para hidrofílicas $\Delta G_{SAS}^{TOT} > 0$, como se apresenta na Tabela 7, sendo a ordem decrescente de hidrofilicidade, a seguinte: BAC (2000 mg/L) > DCICNA > BAC+ETB (6250 mg/L).

Os tensoativos alteram hidrofobicidade das superfícies, e portanto de interferem, na interação entre, a superfície vegetal/superfície da bactéria no

processo de adesão. Sendo as alterações, na superfície de adesão função do tipo de tensoativo utilizado (catiônico, aniônico, não iônico e/ou anfótero) e da concentração do mesmo. (DALTIM, 2011).

A alteração da hidrofobicidade das superfícies, pela ação dos tensoativos, também foi relatada por FENG et al.(2013). E a hidrofobicidade é um fator que influencia na adesão das células bacterianas sobre as superfícies vegetais (ZHAO *et al.*, 2014).

As propriedades físico-químicas e termodinâmicas das superfícies influenciam na adesão das células bacterianas, sejam estas gram-positivas ou gram-negativas, baseados nas análises das características da superfície, em termos de carga elétrica e hidrofobicidade (VADILLO-RODRIGUEZ, 2006).

Baseados na interação das energias livres das superfícies (bactéria-vegetal), se calcula a energia de adesão, que é favorável à adesão se o valor da energia de adesão é negativa (HORI e MATSUMOTO, 2010).

Na Tabela 8 são apresentados os valores para a energia livre de adesão total $\Delta G_{adesão}^{TOT}$ entre *Salmonella* Enteritidis e as superfícies de maçã, tomate e rúcula pré-tratadas com soluções de DCICNA, BAC e BAC + ETB.

O sistema de adesão bactéria/vegetal foi favorável para a adesão, no caso de S.Enteritidis/superfície de maçã, com um $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -61,45 \text{ mJ/m}^2$. No entanto as superfícies de maçã com pré-tratamento, tiveram o $\Delta G_{adesão}^{TOT}$ alterado, para menos favorável à adesão de S. Enteritidis, em todos os casos. Exceto com o pré-tratamento de BAC+ETB (100 mg/mL)/S. Enteritidis, em que o valor de $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -71,5 \text{ mJ/m}^2$, favorável à adesão bacteriana, (Tabela8).O sanitizante que mais inibiu a adesão de S. Enteritidis foi o BAC (2000 mg/L), com um $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -9,47$, Tabela 8.

Na superfície do tomate o $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -51,08 \text{ mJ / m}^2$, favorável para a adesão de S. Enteritidis. No entanto superfícies de tomate com pré-tratamento alteraram a $\Delta G_{adesão}^{TOT}$ do sistema S. Enteritidis/superfície do tomate, tornando as superfícies desfavoráveis para a adesão de S. Enteritidis, o tratamento com

BAC 2000 mg/L, obteve o menor valor para $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -13,36 \text{ mJ / m}^2$, seguido do (BAC+ETB) 100 mg/mL, $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -16,53 \text{ mJ / m}^2$, Tabela 8.

O sistema *S. Enteritidis*/superfície de rúcula, com $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -8,28 \text{ mJ / m}^2$ para a energia de adesão bacteriana é favorável para a adesão de *S. Enteritidis*. Entre tanto as superfícies de rúcula pré-tratadas individualmente, com tensoativos catiônicos, foram alteradas, e os valores de $\Delta G_{adesão}^{TOT}$, para todos os pré-tratamentos, passaram a ter valores positivos, isto é, menos favoráveis para a adesão de *S. Enteritidis* que a superfície de rúcula sem pré-tratamento.

TABELA 8. Energia livre de adesão (mJ/m^2) entre a *Salmonella* Enteritidis e a superfícies de maçã, tomate e rúcula condicionadas com dicloroisocianurato de sódio, cloreto de benzalcônio em duas concentrações e BAC+ETB em duas concentrações

Espécie bacteriana/ Superfície	Energia Livre de Adesão (mJ / m^2)		
	G_{bls}^{LW}	ΔG_{bls}^{LW}	$\Delta G_{adesão}^{TOT}$
<i>S. Enteritidis</i> / maçã / água	-53,65	-7,79	-61,45
<i>S. Enteritidis</i> / maçã / DCICNA (200 mg/L)	- 53,59	38,19	-15,41
<i>S. Enteritidis</i> /maçã /BAC- (2000 mg/L)	- 58,84	49,37	- 9,47
<i>S. Enteritidis</i> / maçã /BAC-(125 mg/L)	- 55,76	20,75	-35,01
<i>S. Enteritidis</i> / maçã /BAC+ETB (100 mg/mL)	- 60,62	-10,91	-71,53
<i>S. Enteritidis</i> / maçã / BAC+ETB (6250 mg/L)	- 59,07	33,99	-25,07
Tomate			
<i>S. Enteritidis</i> / tomate / Água	- 54,51	3,43	- 51,08
<i>S. Enteritidis</i> / tomate / DCICNA (200 mg/L)	-50,46	21,63	- 28,83
<i>S. Enteritidis</i> / tomate / BAC(2000 mg/L)	- 59,86	37,24	- 22,62
<i>S. Enteritidis</i> / tomate/ BAC (125 mg/L)	- 48,26	34,89	-13,36
<i>S. Enteritidis</i> / tomate /BAC+ETB (100 mg/mL)	- 63,04	46,51	-16,53

S. Enteritidis / tomate /BAC+ETB (6250 mg/L)	- 60,443	14,83	- 45,61
Rúcula			
S. Enteritidis / rúcula / água.	-1,79	-6,48	-8,28
S. Enteritidis / rúcula / DCICNA (200 mg/L)	-2,43	10,72	8,29
S. Enteritidis / rúcula / BAC (2000 mg/L)	-1,63	50,71	49,07
S. Enteritidis / rúcula/ BAC (125 mg/L)	-3,16	23,62	20,46
S. Enteritidis /rúcula/BAC+ETB (100 mg/mL)	-2,78	37,85	35,74
S. Enteritidis / rúcula /BAC+ETB (6250 mg/L)	-3,16	41,23	38,70

As siglas correspondem a: DCICNA (dicloroisocianurato de sódio); BAC (cloreto de benzalcônio); BAC+ETB.

Em função dos valores obtidos para $\Delta G_{adesão}^{TOT}$, o pré-tratamento mais eficiente na inibição da adesão de *S. Enteritidis* sobre a superfície da rúcula foi em ordem decrescente: BAC 2000 mg/L > (BAC+ETB) 6250 mg/L > (BAC+ETB) 100 mg/mL > BAC 125 mg/L > DCICNA.

Na tabela 9, são apresentados os valores de $\Delta G_{adesão}^{TOT}$ para *S. aureus*/superfície vegetal. Os vegetais avaliados foram tomate, maçã e rúcula.

A aplicação de pré-tratamentos na superfície dos vegetais alteraram a hidrofobicidade das superfícies em consequência foram alterados os valores de energia livre de adesão bacteriana. Por exemplo no sistema *S. aureus*/superfície de maçã, o controle que apresentou uma $\Delta G_{adesão}^{TOT}$ de -74,4 mJ/m², considerada, termodinamicamente favorável para o sistema de adesão de *S. aureus* sobre a superfície de maçã, Tabela 9.

O pré-tratamento com solução de BAC (2000 mg/L) o sistema *S. aureus*/superfície de maçã foi alterado, ficando termodinamicamente desfavorável com $\Delta G_{adesão}^{TOT} = 3,28$, o mesmo aconteceu, com os pré-tratamentos com soluções de DCICNA, BAC 125 mg/L e BAC+ETB 6250 mg/L, correspondendo valores de $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -3,77$ mJ/m²; $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -30,54$ mJ/m² e $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -46,7$ mJ/m², respectivamente

Tabela 9. Energia livre de adesão (mJ / m²) entre *S. aureus* e as superfícies de maçã, tomate e rúcula condicionadas com dicloroisocianurato de sódio, cloreto de benzalcônio em duas concentrações e BAC+ETB em duas concentrações

Espécie bacteriana/ Superfície	Energia Livre de Adesão (mJ / m ²)		
	$\Delta G_{b/s}^{LW}$	$\Delta G_{b/s}^{AB}$	$\Delta G_{adesão}^{TOT}$
<i>S. aureus</i> / maçã / água	-54,33	- 20,08	- 74,41
<i>S. aureus</i> / maçã / DCICNA (200 mg/L)	-54,282	50,52	- 3,77
<i>S. aureus</i> / maçã / BAC(2000 mg/L)	-59,88	63,15	3,28
<i>S. aureus</i> / maçã / BAC(125 mg/L)	- 56,60	26,06	-30,54
<i>S. aureus</i> / maçã / BAC+ETB (100 mg/mL)	- 61,79	-16,75	- 78,53
<i>S.aureus</i> / maçã / BAC+ETB (6250 mg/L)	47,127	0,43	- 46,70
Tomate			
<i>S. aureus</i> / tomate / água	- 55,245	- 4,311	- 59,56
<i>S. aureus</i> / tomate / DCICNA(200 mg/L)	- 50,930	27,030	- 23,90
<i>S. aureus</i> / tomate / BAC(2000 mg/L)	- 60,974	48,615	- 12,36
<i>S. aureus</i> / tomate/ BAC (125 mg/L)	- 48,582	45,690	- 2,89
<i>S. aureus</i> / tomate/ BAC+ETB (100 mg/mL)	- 64,368	62,262	- 2,11

<i>S. aureus</i> / tomate/ BAC+ETB (6250 mg/L)	- 61,59	17,536	- 44,06
Rúcula			
<i>S. aureus</i> / rúcula / água.	- 52,369	- 14,74	- 67,11
<i>S. aureus</i> / rúcula / DCICNA	-2,4	12,96	10,52
<i>S. aureus</i> / rúcula / BAC (2000 mg/L)	-1,64	64,64	62,9
<i>S. aureus</i> / rúcula / BAC(125 mg/L)	-3,17	29,45	26,27
<i>S. aureus</i> /rúcula/ BAC+ETB (100 mg/mL)	- 2,79	48,17	45,38
<i>S. aureus</i> / rúcula/ BAC+ETB (6250 mg/L)	-3,17	52,17	49,19

O tratamento BAC+ETB (100 mg/mL) foi a exceção, uma vez que tornou sistema de adesão termodinamicamente mais favorável, atingindo após o tratamento o valor de $\Delta G_{adesão}^{TOT} = -78,53 \text{ mJ/m}^2$, maior que do controle, Tabela 9. Simões et al. (2000), encontraram o mesmo efeito, ao estudarem o incremento da concentração do tensoativo CETAB sobre *Pseudomonas*, constaram pelo valor de $\Delta G_{adesão}^{TOT}$ que o sistema ficou favorável para a adesão.

4.2. Adesão bacteriana nas superfícies de tomate, e rúcula pré-tratadas com tensoativos

As superfícies vegetais pré-tratadas com tensoativos apresentaram diferenças na adesão bacteriana, (Tabela 10). As contagem de *S. aureus* aderidas à superfícies de tomate e de rúcula sem pré-tratamento, foram de: 5,66 log(UFC/cm²) e 6,57 log(UFC/cm²), respectivamente. Para as mesmas superfícies, o pré-tratamento com BAC+ETB foi o mais eficiente na inibição da adesão de *S. aureus*, (P<0,05). Assim para o pré-tratamento com BAC+ETB(6250 mg/L) a contagem foi de 0,16 log(UFC/cm²) na superfície do tomate e de 0,05 log (UFC/cm²) para a rúcula.

Os pré-tratamentos com BAC e de DCICNA não inibiram a adesão bacteriana (P>0,05), na superfície de tomate. Entretanto na superfície de rúcula, todos os pré-tratamentos inibiram o processo de adesão (P<0,05) em

relação ao controle. Assim para o BAC (2000 mg/L) a contagem foi de 5,48 log (UFC/cm²), e para BAC (125 mg/L) a contagem foi de 5,20 log(UFC/cm²), sendo entre ambas, a mais eficiente a solução de BAC (2000 mg/L), (Tabela 10).

Tabela 10. Logaritmo de UFC/cm² de *Staphylococcus aureus* aderidos à superfície de tomate e de rúcula condicionadas com tensoativos

Bactéria	<i>S.aureus</i> aderida nas superfícies vegetais Com pré-tratamento log(UFC /cm ²)	
Pré-tratamento	Tomate	Rúcula
Controle (água)	5,66± 0,6a	6,57 ± 0,2a
DCICNA (200 mg/L)	4,73 ± 0,1 ab	5,31 ± 0,8b
BAC-(2000 mg/L)	5,48 ± 0,5a	3,96 ± 1,0c
BAC (125 mg /L)	5,20 ± 0,5a	5,35 ± 1,1b
BAC+ETB (100 mg / mL)	3,83 ± 0,6b	0,04 d ± 0,02d
BAC+ETB (6250 mg / L) `	0,16 ± 0,1c	0,05 d ± 0,03

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As siglas correspondem a: DCICNA (dicloroisocianurato de sódio); BAC (cloreto de benzalcônio); BAC+ETB (cloreto de benzalcônio +Etilbenzalcônio).

Oh et al.(2015) ao pesquisar a adesão bacteriana em superfícies de diferente hidrofobicidade, conseguiram uma diminuição na adesão das bactérias *S. Typhimurium* e *Listeria innocuade* no máximo 1 ciclo logarítmico pela influência, atribuída à hidrofobicidade.

No presente trabalho, pelo pré-tratamento foram conseguidas diminuições na contagem respeito do controle de até 5,5 logaritmos (UFC/cm²) na adesão de *S. aureus* sobre a superfície de tomate e 6,52 logaritmos (UFC/cm²) e na superfície de rúcula, (Tabela 10). Estas superfícies apresentam diferentes valores de energia de interação hidrofóbica ΔG_{SAS}^{TOT} , com pré-tratamento de BAC+ETB (6250 mg/L), Tabela 7. No entanto, não podemos atribuir essa alta diminuição somente à alteração da hidrofobicidade, também deve ser considerada a capacidade bactericida dos compostos utilizados, Tabela 12.

Em relação aos tensoativos BAC e (BAC+ETB), a previsão termodinâmica foi compatível com a adesão de *S. aureus* na superfície da folha da rúcula mas não para a superfície do fruto tomate. Para BAC obteve-se uma adesão maior que para (BAC+ETB), sendo que pela energia de adesão esperava-se que ocorresse o contrário. Entretanto, a solução de BAC menos concentrada preveniu melhor a adesão do micro-organismo para os sistemas *S. aureus*/tomate/BAC e *S. aureus*/rúcula/BAC. Em função a isso pode ser devido à capacidade dos tensoativos de formar micelas em soluções concentradas.

A diferença de comportamento da superfície tratada com BAC em concentrações diferentes poderia ser explicada pela propriedade dos tensoativos de formar micelas. A suspensão de concentração, 2000 mg/L está acima do valor da CMC (1800 mg/L) para o BAC, o que indica que em esse ponto coexistem micelas e monômeros. E sendo a superfície do tomate hidrofóbica (-38,40 mJ/m²) e carregada negativamente, só os monômeros com a carga positiva disponível se aderiram na superfície do tomate. Entretanto as micelas têm a parte carregada positivamente, que fica exposta e a parte hidrofóbica reunida no interior da micela. Energeticamente, é pouco provável que as micelas fiquem aderidas na superfície do tomate, por elas estão na forma de micela para diminuir a energia do sistema, e pelo gasto energético seria mais difícil que as micelas fiquem fixadas na superfície do tomate. Pelo que para uma suspensão de BAC (2000 mg/L) obteremos menor quantidade de monômeros por unidade de superfície em comparação com BAC (125 mg/L), impedindo a adesão bacteriana na superfície do tomate. Além disso a maior capacidade bactericida do BAC é na forma de monômeros, pela atividade do

cátion do amônio quaternário que se fixa na superfície da membrana celular das bactérias.

Analisando os valores de $\Delta G_{\text{adesão}}$ Total observa-se que as superfícies ficaram menos hidrofóbicas. Isto é, em solução aquosa, a superfície do tomate repele com menor força as moléculas água. Por outro lado, a superfície da bactéria é hidrofílica e estará fortemente solvatada pelas moléculas de água. A remoção da lâmina de água entre as duas superfícies é dificultada, com isso a interação e adesão ficam menos favoráveis, pois haverá um maior gasto energético para a dessolvatação.

Com o tratamento BAC+ETB nas duas concentrações utilizadas obteve-se baixa adesão na superfície de rúcula e tomate, porém na concentração de BAC+ETB(100 mg/mL) em tomate para *S. aureus*, não se inibiu totalmente a adesão bacteriana e $3,82\log(\text{UFC}/\text{cm}^2)$ ficaram aderidos. Já a concentração mais diluída conseguiu inibir totalmente a adesão de *S. aureus*. O resultado está de acordo com a avaliação termodinâmica da energia livre de adesão, para a BAC+ETB, que previu que o sistema ficaria menos favorável, para a solução mais diluída, com a superfície do tomate.

A provável explicação para essa diferença de comportamento termodinâmico entre a substância BAC e (BAC + ETB) pode estar em suas composições. O BAC como substância com grau de pureza de 99 % apresenta um comportamento mais homogêneo e portanto mais homogêneo nas suas características físico-químicas, particularmente na formação de monômeros e micelas. Em contrapartida, (BAC+ETB), provavelmente, contém outras substâncias coadjuvantes que interagem e modificam as características individuais dos princípios ativos antimicrobianos.

Um resultado, obtido em nosso experimento, pode demonstrar esse fato, a tensão interfacial das soluções sanitizantes, na concentração de BAC (6,25 mg/L), a tensão interfacial do BAC foi de $55,33 \text{ mJ}/\text{m}^2$ e do BAC + ETB foi de $38,82 \text{ mJ}/\text{m}^2$ o que facilitaria a interação do sistema *S. aureus*/vegetal/ BAC + ETB. Além disso, o efeito da hidrofobicidade da superfície de adesão não pode ser considerado o único que é responsável na adesão bacteriana.

Oh *et al.*(2015) afirmam que existem também as forças de vander Waals, movimento Browniano e efeito da carga elétrica na superfícies e aquelas, próprias das bactéria e da superfície do tomate que podem ter proteínas, e/ou substâncias que atraem à bactéria que poderiam induzir uma maior adesão.

Partículas hidrofílicas tendem a aderir-se sobre superfícies hidrofílicas, (Chandler *et al.*, 2005). Entretanto Oh *et al.* (2015) relataram que bactérias gram positivas como *Listeria innocua* e gram negativas como *Salmonella* Typhimurium não apresentaram diferença significativa na adesão, sobre uma mesma superfície hidrofóbica.

Na Tabela 11, são apresentados os resultados da adesão de *Salmonella* Enteritidis sobre as superfícies de tomate e rúcula. Observou-se que o pré-tratamento da superfície do tomate e rúcula com soluções de BAC+ETB, nas duas concentrações inibiu a adesão da bactéria, sendo a concentração de 100 mg/mL a mais eficiente ($P<0,05$), seguida de BAC+ETB(6250 mg/L).O pré-tratamento de tomate com BAC na duas concentrações diminuíram a adesão de *S. Enteritidis* em relação ao controle ($P<0,05$), sendo BAC (2000 mg/L) a mais eficiente, entre as duas, entretanto ambas menos eficientes que o BAC+ETB nas suas duas concentrações.

Tabela 11. Logaritmo UFC/cm² de *Salmonella* Enteritidis aderida à superfície de tomate e rúcula com pré-tratamento com tensoativos

Bactéria	Adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis	
Superfícies Vegetais pré-tratamento	Tomate	Rúcula
Água	7,78 + 0,2 ^a	7,96 ± 0,3a
DCICNA (200 mg/L)	7,36 ± 0,10 ^a	7,30 ± 0,3b
BAC (2000 mg/L)	3,86 ± 0,10c	6,0 ± 0,1c
BAC (125 mg/L)	5,02 ± 0,70b	7,86 ± 0,1a
BAC+ETB (100 mg / mL)	0,10 ± 0,1d	0,25 ± 0,1e
BAC+ETB (6250 mg / L) `	3,55 ± 0,2c	3,80 ± 0,4d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As siglas correspondem a: DCICNA (dicloroisocianurato de sódio); BAC (cloreto de benzalcônio); BAC+ETB (cloreto de benzalcônio + Etilbenzalcônio).

A maior inibição na adesão de *S. Enteritidis* na superfície de tomate e rúcula foi para o pré-tratamento com BAC+ETB (100 mg / mL), Tabela 11, o mesmo pré-tratamento, conseguiu uma maior alteração da hidrofobicidade respeito do controle, alterando as superfícies de tomate e rúcula, de hidrofóbicas para hidrofílicas, Tabela 7. Isto corrobora a influência da hidrofobicidade no processo de adesão bacteriana, e é condicente com o valor positivo de energia livre de adesão, para este processo o que indica que a adesão foi desfavorável para *S. Enteritidis* sobre estas superfícies vegetais, pré-tratadas, Tabela 8.

Entre tanto o mesmo tensoativo com concentração BAC+ETB (6250 mg / L), alterou de forma menos drástica a hidrofobicidade das superfícies de tomate e rúcula, pré-tratadas, Tabela 7. Isto foi refletido em uma maior adesão *S. Enteritidis* em aquelas superfícies vegetais, Tabela 11. E condicentes com os valores de energia livre de adesão de *S. Enteritidis* sobre superfície do tomate, Tabela 8.

4.3. Sanitização das superfícies vegetais com diferentes agentes tensoativos

As soluções dos agentes sanitizantes aplicadas sobre a superfícies vegetais contaminadas com *S. Enteritidis* apresentaram eficiência antimicrobiana, Tabela 12. A solução do tensoativo BAC+ETB foi o mais eficiente sobre todas as superfícies vegetais, atingindo 4,8; 6,1 e 5,6 reduções decimais na população microbiana. As soluções de BAC(125 mg/L) e de DCICNA, apresentaram ação bactericida semelhante ($p>0,05$) entre elas, sobre *S. Enteritidis*. Exceto na superfície da rúcula, em que BAC ($p>0,05$) foi mais eficiente que o DCICNA. Entre tanto BAC (125 mg/L) e DCICNA tiveram menor eficiência que a solução de BAC+ETB para as superfícies de maçã, tomate e rúcula.

A sanitização com BAC (125 mg/L) apresentou atividade bactericida na superfície de maçã tanto para *S. Enteritidis* quanto para *S. aureus*, apresentando maior eficiência sobre *S. aureus*. Entre tanto com o mesmo sanitizante na superfície de tomate, a maior eficiência bactericida foi sobre *S. Enteritidis*.

Velazquez et al. (2009), relataram a sanitização de tomate contaminado com *Yersinia enterocolitica* e *E. coli* O157:H7 com BAC (100 mg/L) as reduções obtidas foram de Logaritmo 4,1 UFC/g e Logaritmo 3,78 UFC/g. Estas reduções estão acima das encontradas neste trabalho para *S. aureus* em tomate (logaritmo de 2,0 UFC/cm²) e *S. Enteritidis* em tomate (logaritmo de 2,8 UFC/cm²).

Tabela 12. Reduções decimais (RD) na população de *S.aureus* e *Salmonella* Enteritidis, individualmente aderidas nas superfícies de maçã, tomate, e rúcula

Superfícies / Sanitizadas	Reduções decimais (RD)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Maçã	Tomate	Rúcula
DCICNA (200 mg/L)	1,9 ± 0,4a	0,9 ± 0,8a	nd
BAC (125 mg /L)	2,3 ± 0,14a	2,0 ± 0,2b	nd
BAC+ETB (6250 mg / L) `	3,6 ± 0,1b	1,0 ± 0,4a	nd
	<i>Salmonella</i> Enteritidis		
	Maçã	Tomate	Rúcula
	Maçã	Tomate	Rúcula
	Maçã	Tomate	Rúcula
DCICNA (200 mg/L)	1,8 ± 0,1a	1,9 ± 0,4a	0,9 ± 0,4a
BAC (125 mg/L)	1,4 ± 0,3a	2,8 ± 0,2a	2,4 ± 0,37b
BAC+ETB (6250 mg/L)	4,8 ± 0,1b	6,1 ± 0,1b	5,6 ± 1,7c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As siglas correspondem a: DCICNA (dicloroisocianurato de sódio); BAC (cloreto de benzalcônio); BAC+ETB (Cloreto de benzalcônio + etilbenzalcônio), nd= não determinado

Três compostos sanitizantes aplicados nas superfícies vegetais de maçã, tomate, e rúcula, contaminada com *S. Enteritidis*. Todos eles, foram mais eficientes na sanitização da superfície do tomate seguida da maçã e a rúcula, Tabela 12. Sendo o sanitizante BAC+ETB o mais eficiente, isto devido provavelmente a sua menor tensão interfacial, respeito dos outros dois compostos utilizados, Tabela 2. O que poderia favorecer um melhor contato entre o sanitizante e as bactérias melhorando a eficiência da sanitização (VELAZQUEZ *et al.*, 2009).

5. CONCLUSÕES

A aplicação de cloreto de benzalcônio e de um formulado comercial à base de cloreto de benzalcônio e etil benzalcônio em superfícies de tomate, maçã e folhas de rúcula alterou a hidrofobicidade das superfícies dos vegetais de hidrofóbica para hidrofílica, inibindo o processo de adesão de *Staphylococcus aureus* e de *Salmonella* Enteritidis, nas superfícies vegetais.

A influência da hidrofobicidade no processo de adesão bacteriana, foi mostrada.

Também foi apresentado que a previsão termodinâmica sobre processo de adesão bacteriana e se este, era favorável ou não. Calculado em base a os ângulos de contato e as tensões interfaciais as previsões termodinâmicas foram cumpridas para todos os processos de adesão com algumas exceções. E que estas exceções provavelmente foram influenciadas pela concentração do tensoativo utilizado.

Os tensoativos mostraram eficiência bactericida em ambos processos de sanitização: a) pré-tratamento das superfícies vegetais por imersão em soluções de tensoativos catiônicos, secado e posterior procedimento de adesão dos micro-organismos e b) adesão dos micro-organismos às superfícies vegetais e posterior e sanitização com os tensoativos.

Independente do micro-organismo e do processo de sanitização, a aplicação do BAC+ETB que associa cloreto de benzalcônio e etil benzalcônio

apresentou maior eficiência bactericida comparado às soluções de cloreto de benzalcônio e dicloroisocianurato de sódio.

Os compostos de amônio quaternário, em particular, o BAC+ETB é uma alternativa ao uso do cloro na sanitização de superfícies dos vegetais.

6. REFERENCIAS

BASTOS, M.S.R., SOARES, N.F.F., ANDRADE, N.J., ARRUDA, A.C., ALVES, R.E., The effect of the association of sanitizers and surfactant in the microbiota of the Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) melon surfaces. **Food Control**. v. 16, p. 369–373, 2005.

BERGER, C.N.; SODHA, S.V.; SHAW, R.K.; GRIFFIN, P.M.; PINK, P.; FRANKEL, G., Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens, Centre for Molecular Microbiology and Infection, **Environmental Microbiology**, v.12(9), p. 2385–2397, 2010.

BEUCHAT, L.R., Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes Infect.** v.4, p. 413- 423, 2002.

BRILHANTE, J.F.; MEDEIROS, H.S.; BERNARDES, C, P. ANDRADE, N. J., Removal of *Salmonella* enterica Enteritidis and *Escherichia coli* from green peppers and melons by ultrasound and organic acids, *International Journal of Food Microbiology*. v. 190, p.9–13, 2014.

BRUINSMA, G.M.; RUSTEMA-ABBING, M.; van der MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J., Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, **Journal of Microbiological Methods**, v.45, issue, 2, p.95 – 101, 2001.

CABO, M. HERRERA, J. CRESPO, M.D. PASTORIZA, L.; Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on, polypropylene, v.20, Issue 5, p. 521–525, 2009.

CHITARRA, M.I. F.; CHITARRA, A. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**, fisiologia e manuseio 2da edição Lavras: UFLA, p.785, 2005.

DALTIN, D., **Tensoativos, química, propriedades e aplicações**, Ed. Blucher A., 2011.

FENG, W.; SWIFT, S.; SINGHAL, N., Effects of surfactants on cell surface tension parameters and hydrophobicity of *Pseudomonas putida* 852 and *Rhodococcus erythropolis* 3586., **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** .v. 105, p. 43 -50, 2013.

FERNANDES, P.É.; SÃO JOSÉ, J.F.B.; ZERDAS, E.R.M.A.; ANDRADE, N.J.; FERNANDES, L.D. S., Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin., *Food Control*, n 41 p, 21-26, 2014.

GUPTA, S. K.; NALLUSWAMI, K.; SNIDER, C.; PERCH, M.; BALASEGARAM, M.; BURMEISTER, D. Outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, A useful method for subtyping exposures in field investigations. **Epidemiology and Infection**, Feb v.5, p .1–9, 2007.

HORI, K.; MATSUMOTO, S.; Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 424- 434, 2010.

KATSIKOIANNI, M.G.; MISSIRLIS YF. Bacterial adhesion onto materials with specific surface chemistries under flow conditions. **Acta Biomater.** 2010.

KUTSAROVA, E.; IVANOVA, S., KYUMURKOV, A.; JORDANOVA, A.; KRASSTEV, R.; ZDRAVKO, L. Surface Chemistry study of the Interaction of

Benzalkonium Chloride with Films of Meibum, corneal Cell Lipids, and Whole Tears. **Biochemistry and Molecular Biology**, 2011.

LEEF, J.W.; FIERER, N., Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables, **Journal. pone.** 0059310, 2013.

Oh, J.K.; PEREZ, K.; KOHLI, N.; KARA, V.; LI, J.; MIN Y.; CASTILLO, A.; TAYLOR, M.; JAYARAMAN, A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; AKBULUT, M., Hydrophobically-modified silica aerogels: Novel food-contact surfaces with bacterial anti-adhesion properties, **Food Control**, v. 52, p.132-141, 2015.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R., Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces, **Brazilian journal of Microbiology**, v. 38, p.318-323, 2007.

PETIT-JIMÉNEZ, D.; CARVALLO-RUÍZ, T.; GONZÁLEZ-LEÓN, A.; SOTELO-MUNDO, R.; BÁEZ- SAÑUDO, R., Composición química de las ceras cuticulares del fruto DE *Mangifera indica* L. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, vol. 10, núm. 1, p. 14-25, 2009.

REINA, D.L.; FLEMING, H.P.; BREIDT, F. JR., Bacterial Contamination of Cucumber Fruit through Adhesion, **Journal of Food Protection**, Vol. 65, n. 12, p. 1881–1887, 2002.

RUIZ-CRUZ.; ISLAS-OSUNA, M.A.; SOTELLO-MUNDO, R.; VASQUEZ, F.; GONZALEZ-AGUILAR G.A., Sanitation procedure affects biochemical and nutritional changes of shredded carrots. **J. Food Sci.** v.72 ,n2, p. 146-152, 2007.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C. S.; PEREIRA, C.; VIEIRA, M.J., The effects of a biocide, and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass, surfaces, **Int. J. Food Microbiol.** v. 121, p.335–34, 2008.

TAFOLLA-ARELLANO, J. C.; GONZALES-LEON, A. TIZNADO-HERNANDEZ, M.; ZACARIAS-GARCIA, L.; BAEZ-SANUDO, R. Composition, physiology and biosynthesis of plant cuticle, **Rev.Fitotec. Mex.** v.36,n1, p. 3 -12, 2013.

UKUKU, D. O.; FETT, W. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated in cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p.924-930, 2002.

VADILLO-RODRIGUEZ, V.; LOGAN, B.E., Localized Attraction Correlates with Bacterial Adhesion to Glass and Metal Oxide Substrata, **Environ, Sci., Technol.**, v. 40, p. 2083 -2988, 2006.

VALCARCE, M.B.; BULSAMEN, S.R.; SÁNCHEZ, S.R., The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper na aluminium brass. **Int. Biodeter & Biodeg.** v.50, p. 61 – 66, 2002.

vAN LOOSDRECHT, M.C.M.; NORDER, W.; LYKLEMA, J. & ZEHNDER, A.J.B., Hidrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion., **Aquat Sci.**, v. 51, p. 103 -104, 1990.

VELAZQUEZ, 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 p.262-268, 2009.

VOGLER, E.A., Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces, **Adv. Colloid Interface Sci.** v.74 , p. 69–117, 1998.

WALKER, S.L.; REDMAN, J.A.; ELIMELECH, M. Influence of growth phase on bacterial dispositon, inteactions in paked-bed colum and radial stagnation point flow ystems. **Environ Sd Technol**, v.39, p. 640 e 641, 2005b.

WANG, H.; FENG, H.; LIANG, W.; LUO, Y.; MALYARCHUK, V., Retention an Removal of *Escherichia coli* AN on Surfaces of Selected Fruits.**Journal of FoodScience**, v. 74, 2009.

ZHAO, W.; WALKER, S.L.; HUANG, Q.; CAI, P., Adhesion of bacterial pathogens to soil colloidal particles. Influences of cell type, natural organic matter, and solution chemistry.**Water research.** v. 53, p. 35-36, 2014.

Capítulo 4.

Sanitização de tomate com cloreto de benzalcônio: efeito nas características físico-químicas e microbiota do tomate cv. italiano

RESUMO

Para o controle dos micro-organismos presentes em frutas e hortaliças, o método mais utilizado é a sanitização química aliada ao uso de baixas temperaturas, o que permite manter a qualidade sensorial e segurança microbiológica dos vegetais. Neste trabalho, tomates do tipo italiano, no estágio verde maduro, foram submetidos a tratamentos de sanitização com soluções de 200 mg/L de cloro residual total, preparados a partir do dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), 125 mg/L de cloreto de benzalcônio (BAC) e 1% de detergente comercial (DET), utilizando-se água como controle. Uma vez sanitizados os tomates foram embalados em bandejas de isopor cobertas com filme de PVC e armazenados a 7 °C por um período de 21 dias, sendo avaliadas a acidez (% de ácido cítrico), sólidos solúveis totais (SST), firmeza (N) e cor dos tomates, a cada três dias e a qualidade microbiológica, no dia zero e no dia 21 de armazenamento. A acidez entre os dias 15 e 18 dos tomates tratados com DCICNA e DET foram menores que os do controle e semelhantes aos do tratamento BAC. Os sólidos solúveis (°Brix), firmeza e a cor vermelha descrita pela relação a^*/b tiveram comportamento similar para os todos os tratamentos, sendo a evolução dos seus valores influenciados tanto pelos tratamentos como pela evolução do amadurecimento. Os tomates tratados, em geral, perderam a firmeza em relação ao controle, sendo o DCICNA e o DET os produtos que mais afetaram essa característica, já as soluções de BAC não apresentaram diferenças comparadas ao controle. Os sólidos solúveis totais, expressos como °Brix apresentaram comportamento cíclico típico, mas foram influenciados por todos os tratamentos e em maior grau pelos tratamentos DET e BAC, com valores que oscilaram entre 3, 20 °Brix, e 3,99 °Brix, até o dia 21. A mudança na cor nos tomates foi influenciada pelos tratamentos, com maior perda de L^* e o maior aumento da relação $(a^* /$

b*) foram para os tratamentos DET e BAC, seguidos do DCICNA em relação ao controle. Os tratamentos com DCICNA e o BAC foram os mais eficientes sobre mesófilos aeróbios no tempo zero de armazenamento. Porém, as contagens desse grupo microbiano não diferiu no 21º de armazenamento, independente do tratamento. Além disso, os sanitizantes foram menos eficientes sobre fungos filamentosos de leveduras.

1. INTRODUÇÃO

Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) é um fruto climatérico que amadurece após colheita. No processo de amadurecimento, ocorrem mudanças metabólicas que conduzem à síntese de carotenoides, licopeno, e também ao amolecimento da parede celular com a consequente perda da firmeza do fruto, a mobilização de carboidratos e açúcares de reserva, atingindo a coloração vermelha brilhante no estágio maduro (ARTES e ARTES, 2007;

Este processo de amadurecimento influencia nas características sensoriais do tomate e podem ser percebidos sensorialmente como a cor, brilho e firmeza ao tato, mais o amadurecimento também influencia propriedades físico-químicas do tomate como acidez total titulável, sólidos solúveis totais, pH, e atividade de água (BALDWIN *et al.*, 2000; SCHOUTEN, *et al.*, 2007).

Todas estas propriedades físico-químicas determinam a qualidade do tomate e são incluídos nos controles para o tomate destinado ao consumo (BATU *et al.*, 2004). Entre tanto para o uso industrial o índice de qualidade é medido pela relação brix / acidez.

Para manter a inocuidade microbiológica do tomate são utilizados sanitizantes, estes devem contribuir com a inocuidade microbiológica sem interferir na qualidade físico-química dos produtos *in natura* durante a vida de prateleira (WARRINER *et al.*, 2009).

Entre os sanitizantes, o cloro é o mais utilizado, embora possa formar compostos cancerígenos, como os trihalometanos, originados da reação do cloro com a matéria orgânica (ARTES *et al.*, 2007b, ARTES *et al.*, 2009).

Santos *et al.* (2005) avaliaram o DCICNA como sanitizante sobre tomates, relataram alteração das propriedades físico-químicas de forma positiva, o que diminui-o em dois dias o tempo de amadurecimento do tomate.

A eficiência dos sanitizantes pode ser diminuída, pela presença de rugosidade e a natureza polar das superfícies vegetais (ÖLMEZ e

KRETZSCHMAR, 2009). Assim, compostos químicos com atividade antimicrobiana, aliada a propriedades tensoativas se apresentam como alternativas promissórias destinadas a reduzir a adesão microbiana.

Compostos de amônio quaternário (CAQs) têm efetividade diferente para o controle de bactérias (McBAIN *et al.*, 2004). Os CAQs têm ação contra *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica* (VELAZQUEZ, *et.al.*, 2009). Diante disso, os CAQs podem ser úteis no controle de determinadas bactérias contaminantes dos vegetais.

O cloreto de benzalcônio (BAC) destaca-se entre os CAQs por ser amplamente utilizado como desinfetante nas linhas e superfícies de processamento na indústria de alimentos (NGOH *et al.*, 2013) e também como conservante antimicrobiano em medicamentos, em concentrações entre 0,1 % a 1 %. Na sanitização de frutas e hortaliças, a sua eficiência é variável quanto às reduções decimais (RD) para distintos micro-organismos em função da concentração utilizada. Assim, a determinação da dose em função do micro-organismo é determinante para uma sanitização eficiente.

Os detergentes, no processo de limpeza podem ser úteis na remoção das bactérias por modificação da interação de superfície vegetal / bactéria e sob mesmo princípio, contribuir com a remoção de esporos de fungos deteriorantes, e a modificação da microtopografia das superfícies vegetais por alterar a integridade estrutural das ceras da epiderme vegetal (COSTA *et al.*, 2012).

O Nitrol WV-2640 (brand Nippon) é um detergente utilizado na concentração de 1% (10mL/L) na indústria de alimentos para lavagem de hortifrúti é composto de óleo de coco e soja, tensoativo não iônico, material saponificante, tamponante, sequestrante, conservante e veículo aquoso (COSTA, 2012). Embora, não seja utilizado como antimicrobiano, tem demonstrado alguma atividade sanitizantes em tomate contaminados com *Salmonella* Enteritidis (BRILHANTE, *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2012). A procura de novas formas de controle e/ou remoção de micro-organismos das superfícies vegetais, para melhorar a qualidade microbiológica dos frutos consumidos frescos, para atender a legislação específica.

Na conservação pós-colheita, além da qualidade do fruto e a inocuidade microbiológica são necessárias temperaturas de conservação entre 8 °C e 10 °C, para a redução das taxas de deterioração fisiológica (BRACKMANN *et al.*, 2007; BALDWIN *et al.*, 2011; RENARD *et al.*, 2013; FILGUEIRA, 2013; PONCE-VALDEZ *et al.*, 2016),

Nesse sentido, os objetivos do presente trabalho foram:

Objetivo Geral

Avaliação de dois compostos de quaternário de amônio e do dicloroisocianurato de sódio na sanitização de tomate tipo italiano.

Objetivos específicos

- a). Caracterização físico-química e microbiológica do tomate tipo italiano
- b). Avaliação do efeito de três tratamentos de sanitização, sobre as características físico-químicas e microbiológicas do tomate tipo italiano, conservados a 7°C por 21 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Tecnologia de Alimentos DTA/UFV, no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHIMA) e no laboratório de Embalagem (LABEM). A etapa de conservação pós-colheita e vida de prateleira foi realizada na unidade de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças do Departamento de Biologia Vegetal DVB/UFV.

2.2. Amostra Vegetal

Tomates do grupo Italiano foram adquiridos de um fornecedor varejista da cidade de Viçosa-MG (Figura 1). Selecionou-se um único padrão, frutos sem qualquer dano físico à inspeção visual e tátil, no estágio verde maduro de desenvolvimento do fruto com 10 % de coloração distinta do verde, denominado róseo, conforme a escala de classificação de cores (*United State Departament of Agriculture*) USDA (1976).

Os frutos selecionados foram lavados com água potável, drenados, aleatorizados e organizados em sub-amostras para compor quatro tratamentos, com três repetições, seis frutos por repetição, e sete tempos de avaliação durante o período de conservação.



Figura. 1 Tomates do tipo italiano, estadio verde maduro

2.2. Tratamentos com sanitizantes

Os sanitizantes utilizados foram o dicloroisocianurato de sódio (DCICNA) na concentração de 200 mg/L de cloro residual total, cloreto de benzalcônio (BAC), na concentração de 125 mg/L, e o detergente comercial Nitrol WV-2640 (DET) a 1 %. Água potável foi utilizada como controle. Os tomates foram tratados com as soluções sanitizantes por imersão por 10 min., drenados, secos ao ambiente, embalados em bandeja de isopor cobertos com filme de PVC e conservados a 7 °C, por 21 dias.

2.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A determinação das propriedades físico-químicas dos frutos ao longo do período de conservação foi realizada a cada três dias a partir de amostragens destrutivas. As características avaliadas estão descritas a seguir.

2.3.1. Cor instrumental

Variações da cor dos frutos foram analisadas com colorímetro Minolta Color Reader CR 10, que utiliza o sistema CIELAB para caracterizar a cor com base em variações das coordenadas L^* , a^* e b^* . L^* expressa a luminosidade variando desde 0 (preto) até 100 (branco), a^* a cromaticidade, do verde (-60) até o vermelho (+60), e b^* a cromaticidade, do azul (-60) até o amarelo (+60). O colorímetro foi calibrado com o azulejo branco padrão com leitura direta de refletância, antes de cada série de medições.

As medições foram realizadas em três pontos da região equatorial dos frutos. Com os dados CIELab foram calculados o índice de vermelhidão a^*/b^* e o ângulo Hue como: $\tan^{-1}(b/a)$ quando $a > 0$ e $b \leq 0$, e $180^\circ + \tan^{-1}(b/a)$ quando $a < 0$. Valores maiores de a^*/b^* e valores menores do ângulo Hue indicam maior avermelhamento do tecido. No ângulo Hue, valores de ângulo = 0° representa vermelho puro e 90° = amarelo puro, 180° = verde puro e 270° = azul puro (CARDOSO *et al.*, 2007).

2.3.2. Acidez Total titulável

A determinação da acidez total titulável (ATT) foi realizada em amostra composta por 3 frutos homogeneizados de cada repetição, durante 3 min em um liquidificador. Do homogenato, 20 g foram centrifugadas a 17.600 g por 13 min à temperatura ambiente (20°C - 25°C). Do sobrenadante, um volume equivalente a 6 g foi misturado com 50 mL de água destilada em um Erlenmeyer. O volume do frasco mais cinco gotas do indicador fenolftaleína a 1 % foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, e os resultados expressos em percentagem de ácido cítrico, calculados a partir da equação (1) conforme AOAC, (1997).

$$\% \text{ ácido cítrico} = \left(ml(OHNa) * N(NaOH) * \frac{0,064}{6} \right) * 100$$

Em que:

N = normalidade do hidróxido de sódio

mL= mililitros de hidróxido de sódio gastos na titulação da amostra

2.3.3. Sólidos solúveis totais

O conteúdo de sólidos solúveis totais expressos como °Brix foi medido no sobrenadante do homogenato centrifugado por 20 min a 17.600 *g*, com refratômetro portátil Atago®. O refratômetro foi previamente calibrado com água deionizada e foram realizadas três medições por cada repetição (AOAC, 1997).

2.3.4. Firmeza

A firmeza do mesocarpo foi medida com texturômetro Instron série (3367-USA 2005) com sonda de 8 mm de diâmetro e velocidade de. 5 m/s (medida direta por célula de carga). Para cada tratamento foram avaliados três frutos com duas medições na região equatorial para cada unidade. No ponto de inserção da sonda, o epicarpo (pele) do tomate foi removido. Os resultados das medidas foram expressos em Newton (N), (BATU, 2004).

2.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A análise microbiológica das amostras de tomate foi realizada para determinação de mesófilos aeróbios, *Pseudomonas* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e fungos e leveduras eo efeito dos sanitizantes sobre o controle dos micro-organismos ao longo de um período de conservação refrigerada de tomates embalados.

A determinação das bactérias foi realizada com 25 g de amostra composta de epicarpo mais mesocarpo procedente de todos os frutos da repetição, em 225 mL de água peptonada 0,1 % e homogeneizada em stomacher (Marconi MA - 440), por 2 min. Este homogenato foi utilizado para preparar as diluições decimais das quais foram tomadas alíquotas utilizadas em meios de cultura específicos para a determinação de cada grupo microbiano conforme

metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES e ITO, 2001). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

Mesófilos aeróbios foram determinados conforme o método de plaqueamento em profundidade, colocando 1 mL de diluições previamente preparadas em placas petri. Em seguida, foram adicionados Ágar Padrão para Contagem (PCA) a 45 °C nas placas petri. A contagem foi realizada após a incubação por 48 h a 35 °C (MORTON, 2001).

A determinação de *E. coli* foi realizada pelo método do Petrifilm™ 3M™. Uma alíquota de 1ml da diluição foi inoculada na superfície do Petrifilm. A contagem foi realizada posterior à incubação por 24 h a 35 °C (AOAC, 2005), enumerando-se como coliformes a 35 °C as colônias vermelhas e azuis associadas com bolhas de gás. (SILVA *et al.*, 2007).

A contagem das bactérias lácticas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade (AOAC, 2005). Um volume de 1 mL da diluição apropriada foi vertida na placa petri, seguidamente foi adicionado Ágar MRS (Himedia) com sobrecamada. As placas foram incubadas a 30 °C por 3 dias (HALL *et al.*, 2001).

Os fungos filamentosos e leveduras foram avaliados por plaqueamento em superfície (AOAC, 2005). O meio utilizado foi Agar Batata Dextrose (BDA, HIMEDIA), acidificado com ácido tartárico a 10 % (v/v) e pH igual a 3,0. (BEUCHAT e COUSIN, 2001). O período de incubação foi de cinco dias a 25 °C, com avaliações do crescimento a cada 24 h.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro tratamentos, três repetições e sete avaliações no tempo de conservação. Os dados dos tratamentos submetidos a análise de regressão (teste t, $P \leq 0,05$), de variância (teste F, $P \leq 0,05$), e as medias discriminadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para a análise estatística foram utilizados os softwares Sigma Plot e Minitab 17.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Acidez Total Titulável

A acidez total titulável (ATT) apresentou diferenças entre os tratamentos ao longo do período de conservação, descrevendo oscilações com picos transientes de magnitudes diferentes (Figura 1).

O tratamento com DET poderia ter induzido o aumento precoce e acentuado da acidez no tempo de conservação três dias, e um segundo pico mais prolongado entre o tempo 12 e 15 dias de conservação, seguido de uma redução continua até o tempo 21 dias de conservação.

O BAC e o controle induziram aumentos semelhantes no dia seis de conservação, a partir de onde houve diminuição continua da acidez, porém com maiores oscilações e queda na acidez do controle.

A solução de DCICNA induziu tardiamente a elevação no tempo da acidez nos frutos (nove dias), com valor máximo menor que os demais tratamentos e queda semelhante ao controle pós-pico, implicando que a DCICNA afetou em menor grau a evolução da acidez. Entretanto, no final do período de conservação a acidez dos tomates tratados com BAC, DCINA e DET foram menores que os do controle.

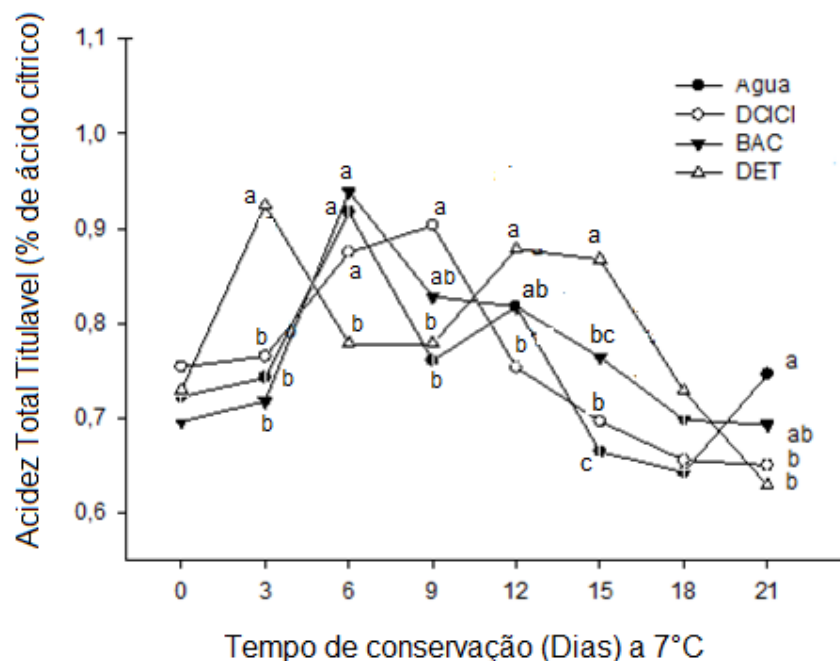


Figura 2. Acidez titulável expressa em percentagem de ácido cítrico em tomate conservado a 7 °C, após tratamento com água (controle), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), cloreto de benzalcônio (BAC), e o detergente comercial (DET). Cada ponto representa a média de quatro repetições. Letras iguais ou ausentes entre os pontos de um mesmo dia são semelhantes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A ATT no tempo, zero dias foi de 0,69 %, passando por 0,95% no tempo 3 dias voltando a descer no tempo 21 dias a 0,64 % de ácido cítrico. A diminuição da acidez durante o período de amadurecimento, é devido a ao consumo dos ácidos orgânicos que são convertidos em açúcares estes a sua vez consumidos durante a respiração e outros processos fisiológicos, (ABUDAK *et al.*, 2007).

Os valores de acidez avaliados neste trabalho são coerente com o amadurecimento do tomate tipo italiano. O tratamento com DET foi o que mais afetou negativamente a acidez, devido a que induziu maiores oscilações da mesma, isto devido, provavelmente, a uma maior taxa respiratória do fruto, induzida pela diminuição da capa de ceras cuticulares, provocada pelo tratamento DET.

As oscilações da acidez durante a conservação podem estar relacionadas aos processos bioquímicos do metabolismo respiratório, com períodos de síntese e consumo de ácidos orgânicos (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Nesse

sentido, pode-se inferir que DET provocou maiores alterações na acidez em relação ao controle, verificado pela antecipação dos dias a ocorrência do pico de acidez, no tempo de conservação de 3 dias.

Contrariamente ao ocorrido com DET, o tratamento BAC teve comportamento semelhante ao controle até a ocorrência do pico, porém, com efeito positivo posterior mantendo nos frutos valores de acidez maiores aos do controle por nove dias, entre os dias 9 e 18 do período de conservação, mais ao final do tempo de conservação as diferenças provocadas pelos tratamentos são anuladas.

No tempo de conservação 21 dias os valores de ATT para todos os tratamentos são similares entre si, isto devido a que a acidez total titulável nos frutos de tomateiro tende a diminuir com tempo de armazenamento independente da cultivar (MISSIO *et al.*, 2015).

4.2. Sólidos solúveis totais (°Brix)

Os sólidos solúveis totais SST apresentaram oscilações semelhantes com dois picos transientes nos dias 6 e 15 do período de conservação (Figura 3).

Durante o primeiro pico no tempo (6 dias) os valores de °Brix do controle foram os menores e no segundo pico teve valores intermediários entre o BAC e os tratamentos DCCINA e DET.

O DET induziu os maiores valores de °Brix no primeiro pico e o BAC no segundo. O DET, DCINA e BAC induziram maiores valores de °Brix em 16 %, 10 % e 8 % acima do controle, no primeiro pico. No segundo pico, somente o BAC foi 11 % maior que o controle, e os tratamentos DET e DCINA 12 e 10 % menores que o controle, respectivamente.

As variações observadas demonstram que os tratamentos induziram diferentemente a mobilização de reservas nos frutos, verificando-se a maior influência dos tratamentos DET e BAC sobre a evolução dos sólidos solúveis totais.

É provável que no tempo de conservação 6 dias a diferença do DET respeito do controle seja devido à uma maior perda de água por parte do fruto de tomate, devido a que é provável que DET removiera uma parte das ceras cuticulares que protegem a superfície do fruto, o que facilita uma maior perda de água, concentrando os sólidos no seu interior, isto também induziria uma maior taxa respiratória o que provoca um grande consumo de energia, o que explicaria os baixos valores de SST para este tratamento no tempo de conservação 15 dias, respeito do controle água.

Para o tratamento BAC no tempo de conservação dia 6 não apresenta diferenças significativas respeito dos tratamentos com DCICNA e do controle. Entre tanto no tempo de conservação 15 dias se apresenta significativamente diferente dos outros tratamentos e igual ao controle. Isto poderia dever-se a que ao ser o BAC um tensoativo catiônico a parte positiva da molécula se liga aos compostos carregados negativamente da superfície do tomate, e a parte hidrofóbica queda exposta mantendo a superfície hidrofóbica é dizer sem alterações no fruto que poderiam induzir a um maior consumo energético.

Os valores e evolução do °Brix encontrados neste trabalho são próximos aos relatados na literatura (VENSKE *et al.*, 2005, SCHOUTEN, 2007, LOPEZ, 2011; VIÑA, 2014). As oscilações nos valores de sólidos solúveis estão relacionados com a hidrólise do amido para a açúcar simples que são utilizados para a manutenção do metabolismo celular durante a conservação pós-colheita de frutas e hortaliças (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Variações nos valores dos sólidos solúveis no fruto de tomate estão relacionados com o metabolismo respiratório o que consome a reserva energética dos frutos (SILVA, *et al.*, 2005).

Os sólidos solúveis totais (SST) variaram desde 2,8 a 4,2 °Brix, estes valores estão próximos a os valores comuns de (SST) do tomate cultivar Italiano. Assim Rauppet *al.*, (2009) encontraram os valores entre 2,9 e 3,5°Brix para este cultivar.

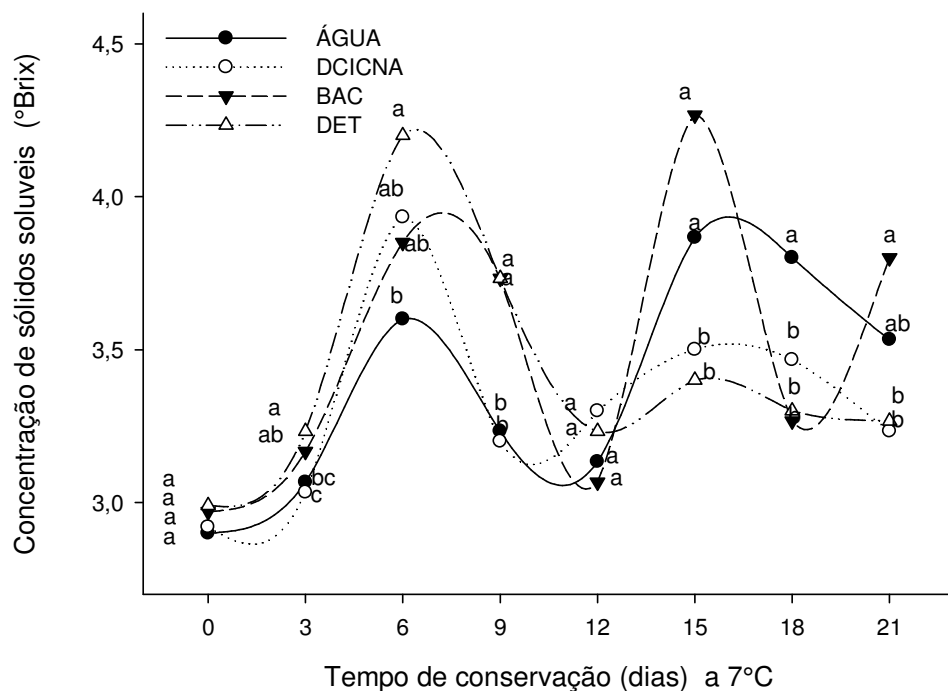


Figura 3. Concentração de sólidos solúveis (°Brix) em tomate conservado a 7 °C, após tratamento com água (controle), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), cloreto de benzalcônio (BAC), e detergente comercial (DET). Cada ponto representa a média de 12 dados. Letras iguais ou ausentes entre os pontos de um mesmo dia são semelhantes pelo teste de Tukey (P < 0,05).

4.3. Ratio (Brix / Acidez)

A relação de Brix / acidez (Figura 4) variou diferencialmente entre os tratamentos em função do comportamento individual da acidez e dos sólidos solúveis ao longo do período de conservação (Figuras 2, 3). De maneira geral, houve aumento da relação Brix/acidez entre os valores do início e final do período de conservação em todos os tratamentos, incluindo o controle (Figura 4).

A evolução da relação Brix/acidez no controle foi estável nos estágios iniciais de amadurecimento até o dia 9, com aumento posterior em duas vezes dos valores de grau Brix/acidez a partir do dia 12 até 18. Os tratamentos com DCICNA, BAC e DET modificaram essa evolução ($P \leq 0,05$) em diversos

momentos do período de conservação, evidenciando-se o efeito dos tratamentos nas propriedades físico-químicas dos tomates.

Entre os tratamentos, o DET provocou maior variabilidade na primeira metade do período de conservação, e o BAC e DCICNA na outra metade. Contudo, o BAC foi o tratamento que menos alterou o padrão de evolução desta característica. Os valores e comportamento da evolução da relação brix / acidez em tomateiro foram semelhantes aos descritos na literatura (SOUZA *et al.*, 2011), com acentuação das oscilações que são função do cultivar (ANJOS *et al.*, 2015). Fruto climatérico perfil esperado.

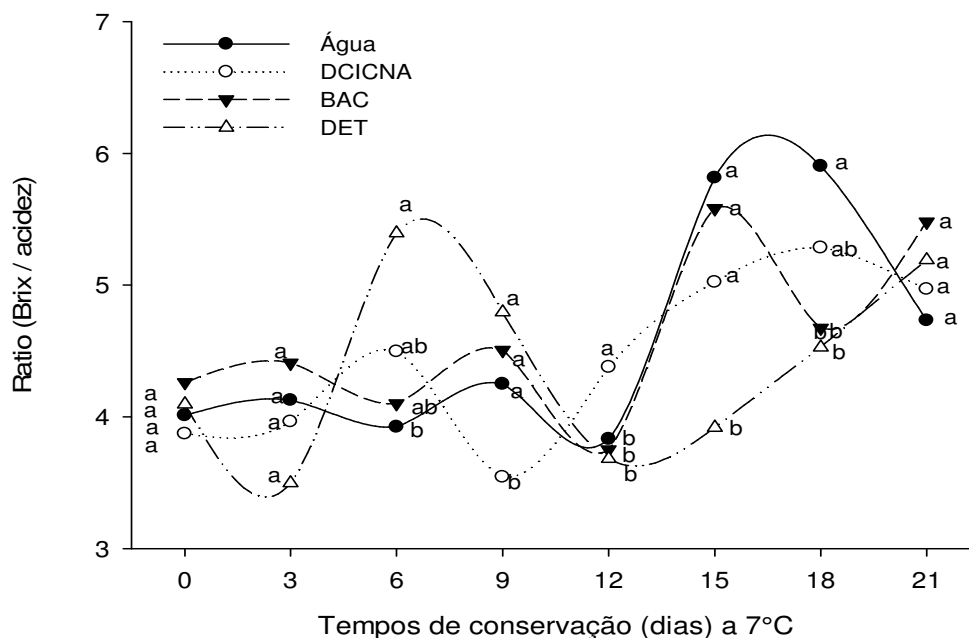


Figura 4. Ratio °Brix / Acidez em tomate conservado a 7 °C, após tratamento com água (controle), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), cloreto de benzalcônio (BAC), e detergente comercial (DET). Cada ponto representa a média de 12 dados. Letras iguais entre os pontos de um mesmo dia são semelhantes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.4. Cor instrumental

Os valores L^* , a^* e b^* da escala de Hunter e o índice de cor vermelha (a^*/b^*) dos tomates tratados com DCICNA, BAC e DET foram diferentes em relação ao controle (Figuras 5, 6, 7, 8).

Na figura 5, pode-se observar que o valor L^* , que representa a luminosidade dos frutos, diminuiu linearmente com o tempo de conservação, independente do tratamento, porém com inclinações diferentes. A perda da luminosidade seguiu o seguinte ordem decrescente água < DCICNA < BAC < DET, com 4,0; 4,7; 4,9 e 5,3 unidades de L^* , respectivamente, no tempo de conservação 0 a 21 dias, sendo que tomates tratados com BAC e DET ficaram visivelmente menos brilhantes no final da conservação, (dia 21), que o controle (Figura 5).

A redução do valor de L^* é comum em frutos de tomateiro durante o amadurecimento (CANTWELL, 2004; LÓPEZ; KHAIRIA *et al.*, 2015). No presente experimento as mudanças foram registradas desde o sexto dia quando foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores de L^* da DCICNA versus o BAC e DET, dados não apresentados neste trabalho. A DCICNA reteve por maior tempo valores elevados de L^* até o tempo de conservação 18 dias. Aos 21 dias, todos os tratamentos apresentaram valores próximos e sem diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os valores de L^* . Assim, pode constatar-se a maior redução de L^* decorrente dos tratamentos avaliados, (Figura 5).

A redução do L^* devida ao aumento da coloração vermelha próprio do processo de amadurecimento se vê aumentada pelo efeito dos tratamentos com tensoativos que reduzem ainda mais os valores de L^* (Figura 5). Esta diminuição no valor de L^* pode ser decorrentes de mudanças na propriedades óticas da superfície dos frutos, e a remoção de componentes específicos da cera epicuticular com mudanças na conformação molecular dos constituintes dissolvidos, resultando no alisamento e redução da espessura da cera da superfície o que pode diminuir a resistência difusiva da membrana cuticular, e aumentar rugosidade superficial por murcha das células epicuticulares, aumentando a refletância difusiva (TAMURA *et al.*, 2001, PETIT *et al.*, 2014).

PETIT et al.(2014) encontraram relação entre a redução do brilho dos frutos e a utilização de Triton X-100 (tensoativo) por alterações provocadas na topografia das ceras, cutina e células epidérmicas mudanças que aumentaram a refletância difusiva.

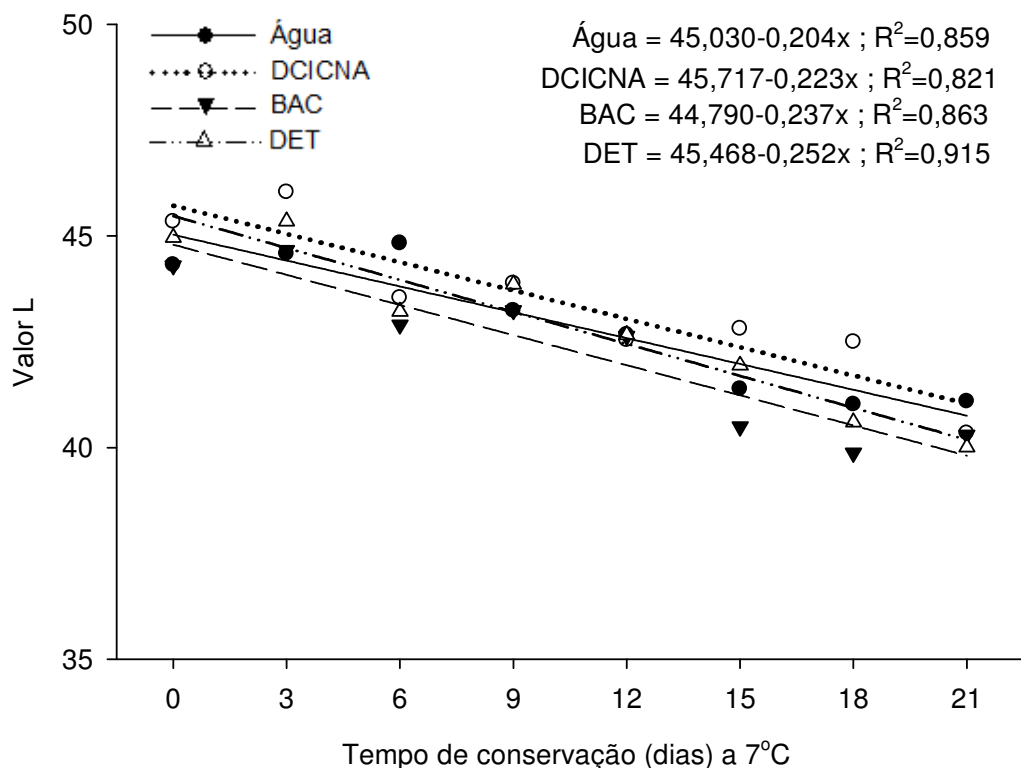


Figura 5. Valor L* em tomate conservado a 7 °C após tratamento com água (controle), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), cloreto de benzalcônio (BAC), e detergente comercial (DET). Cada ponto representa a média de quatro repetições. Cada ponto nas retas representa a média de 12 dados.

O valor a^* que descreve mudança da cor verde para o vermelho aumentou a partir do sexto dia em todos os tratamentos, seguindo uma curva sigmoide (Figura 6). Frutos tratados com BAC e o controle variaram de forma semelhante ao longo de todo o período de conservação. Já, os frutos tratados com DCICNA e DET mostraram estabilidade no valor a^* entre os 12 e 21 dias, e tiveram menor coloração vermelha dos frutos em relação ao controle e aos tratados com BAC.

Conforme as equações de resposta ajustadas, a DCICNA e DET aumentaram, respectivamente, o valor de a^* em 5,9 e 7,4 unidades, entre o início e final do período de conservação, versus aumentos de 8,1 e 10,4 unidades de a^* induzidas pelo controle e BAC, (Figura 6).

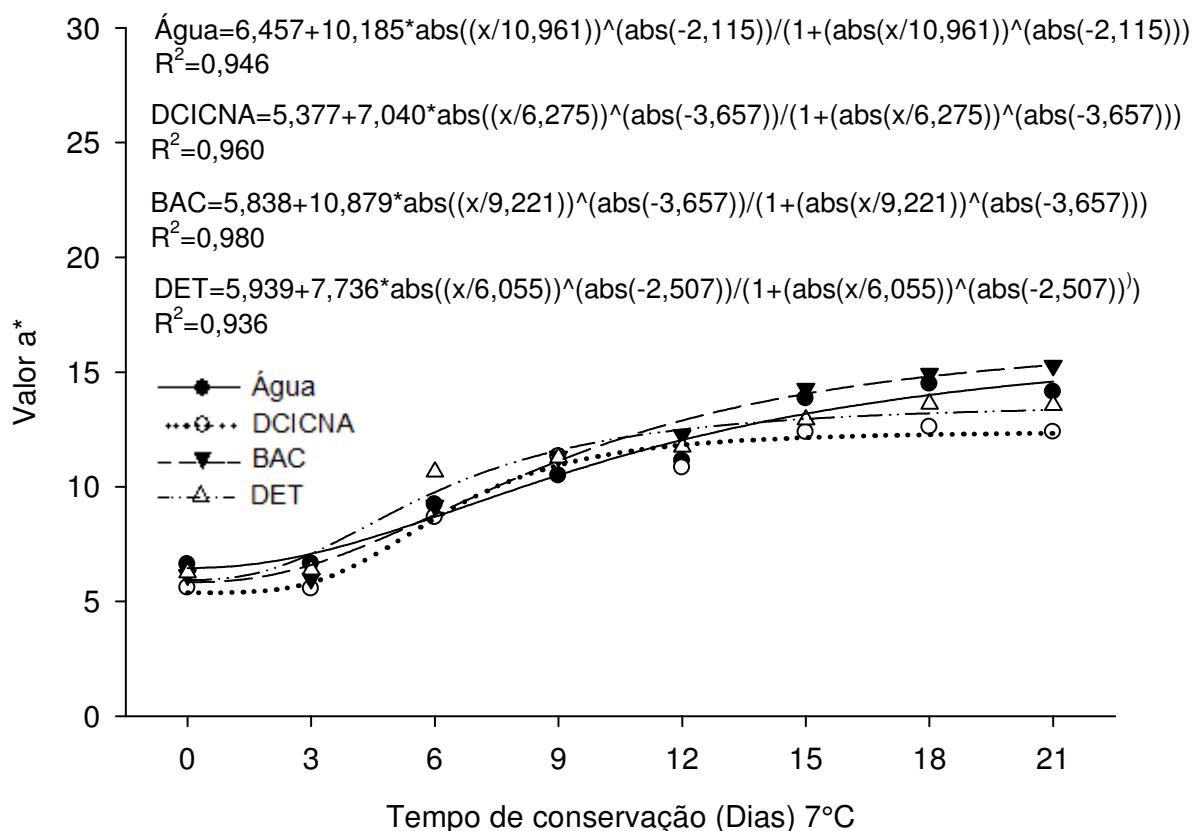


Figura 6. Valor a^* em tomate conservado a 7 °C, após tratamento com água (controle), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), cloreto de benzalcônio (BAC), e detergente comercial (DET). Cada ponto representa a média de quatro repetições. Cada ponto nas retas representa a média de 12 dados

Os resultados nos valores a^* mostram que os tratamento com cloro (DCICNA) e o tensoativo DET atrasaram a formação da cor vermelha, por mecanismos não determinados no presente trabalho. O valor a^* em frutos de tomate aumenta ao longo do período de armazenamento e está associado com a degradação das clorofilas, a síntese de carotenoides e de licopeno. Estes dois últimos compostos estão constituídas por unidades de isoprenos, e a

síntese de carotenoides é fundamental para a síntese de licopeno (TAIZ e ZEIGER, 2006).

O valor b^* aumentam linearmente desde o tempo zero dias até o tempo 15 dias, nos frutos tratados com DCICNA, BAC e DET comparado com o controle (Figura 7). No tempo de conservação dia 15 até o tempo 21 dias, houve estabilização do valor b^* para os tratamentos com BAC e DET e queda no tratamento DCICNA, provavelmente devido ao fato dos frutos ficarem mais vermelhos (Figura 6) reduzindo os valores de b^* , particularmente no tratamento com DCICNA. No final do período de conservação todos os tratamentos diferiram do controle ($P \leq 0,05$).

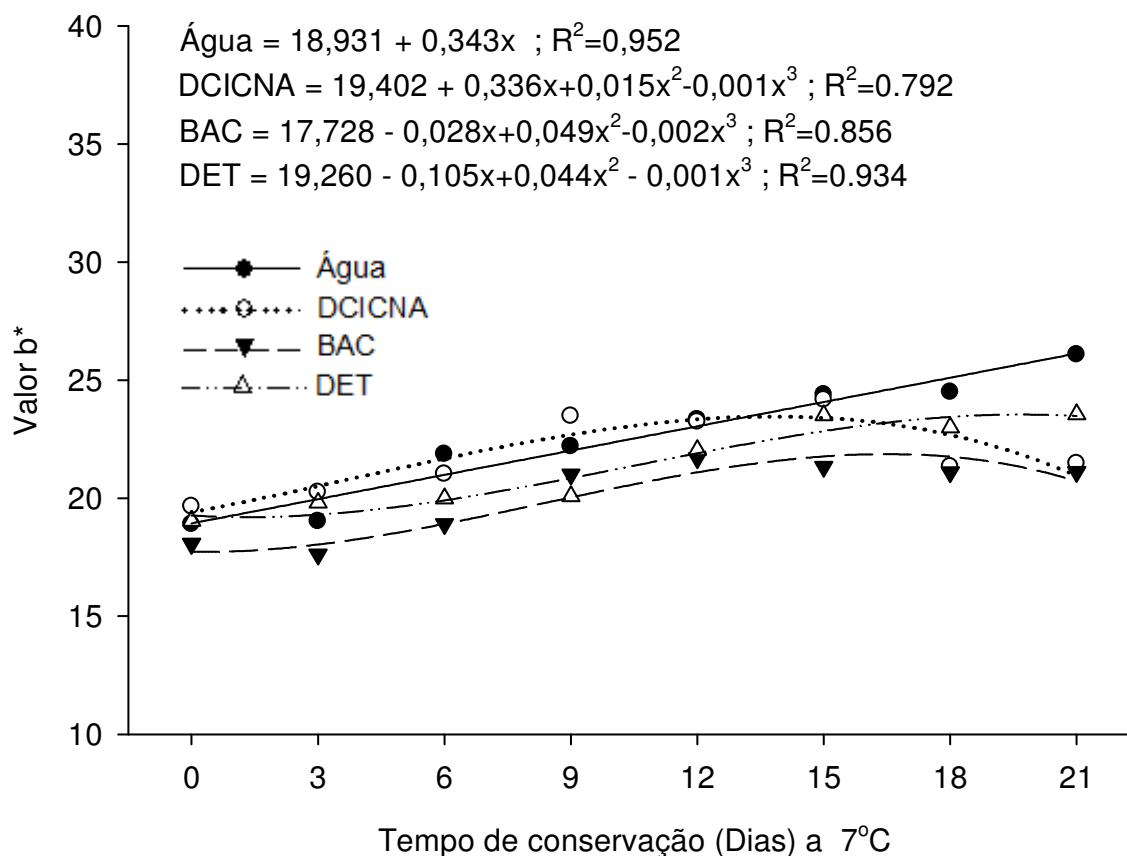


Figura 7. Valor b^* em tomate conservado a 7°C após tratamento com água (controle), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), cloreto de benzalcônio (BAC), e detergente comercial (DET). Cada ponto representa a média de quatro repetições. Cada ponto nas retas representa a média de 12 dados

A relação a^*/b^* apresenta um aumento sigmoide entre o início e o final do período de conservação independente do tratamento. Entre os tratamentos, aplicados o DCICNA teve comportamento semelhante ao controle, e aumentos de 0,30 e 0,23 unidades, respectivamente, entre o dia 0 e 21. O DET estimulou um aumento precoce e de menor magnitude (0,20 unidades) da relação a^*/b^* até o sexto dia, a partir de onde se estabilizou. Já o BAC induziu aumento contínuo em 0,4 unidades, até o final do período de conservação, sem apresentar um platô, implicando que este tratamento favoreceu a síntese de licopeno em relação a todos os outros tratamentos, (Figura 8). Valores mais altos da relação a^*/b^* expressam maior tonalidade vermelha, e pode ser utilizada para dar um valor à percepção da cor vermelha (GÓMEZ, 2004).

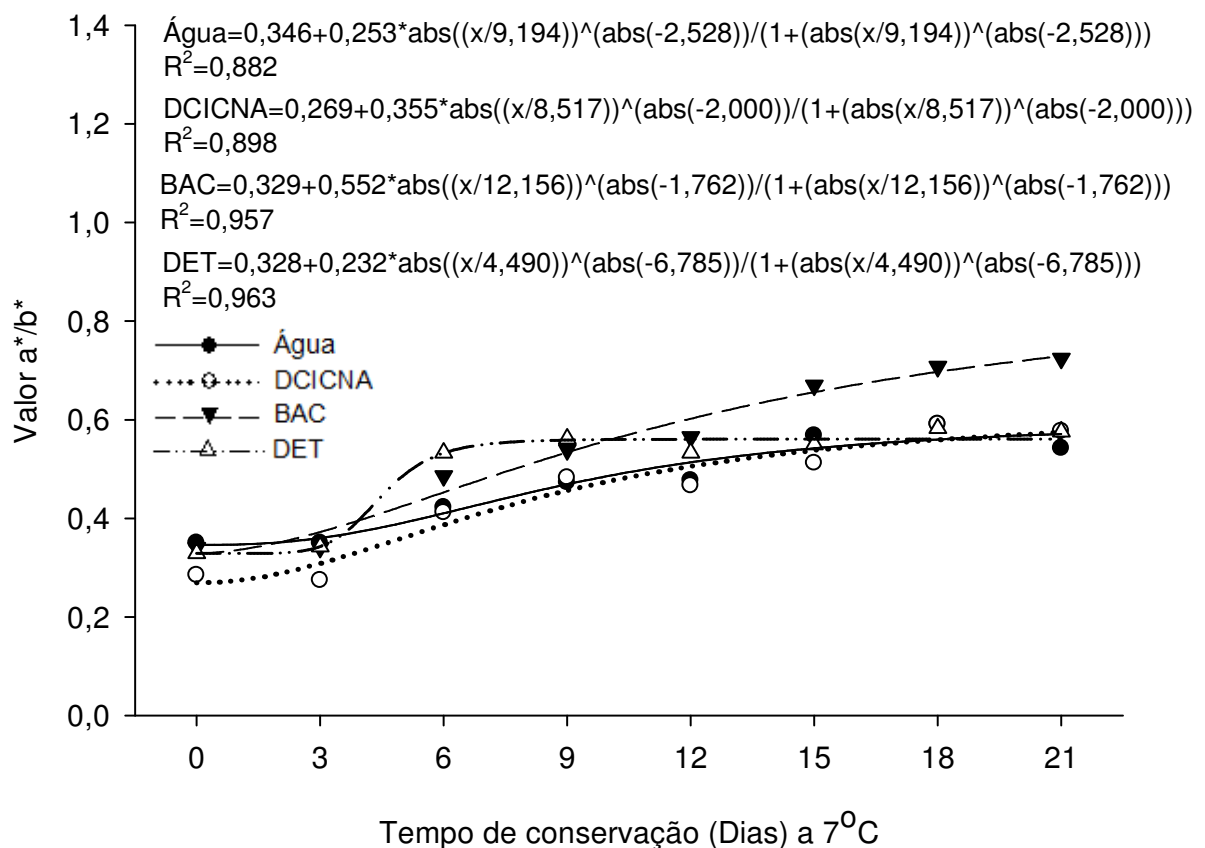


Figura 8. Relação a^*/b^* em tomate conservado a 7 °C, após tratamento com água (controle), dicloroisocianurato de sódio (DCICNA), cloreto de benzalcônio (BAC), e detergente comercial (DET). Cada ponto representa a média de quatro repetições. Cada ponto nas retas representa a média de 12 dados.

Dos resultados apresentados nas figuras 5 a 7, constata-se que os tensoativos DET e BAC influenciaram positivamente a evolução da cor vermelha dos frutos (Figura 6).

O DCICNA aumentou a coloração amarela dos frutos nos primeiros 15 dias de conservação, o efeito se faz mais evidente, quando se considera que as baixas temperaturas não interferem na síntese de licopeno, particularmente temperaturas ao redor de 10 °C (JAVANMARDI e KUBOTA, 2006, KHAIRI *et al.*, 2015).

4.5. Firmeza

A perda de firmeza dos frutos de tomate no tempo 21 dias para o controle (água) foi de 46,43 %, e para os tratamentos DET e DCICNA foram de 61,26 % e 57 % respectivamente, estes valores são maiores que os apresentados para o tratamento com BAC, que foi de 46,13 %, em relação ao controle (água) no tempo zero dias, (Tabela 1).

Estes resultados são similares aos resultados relatados por Sagon *et al.* (2011) e Alexandre *et al.* (2012), em trabalhos de avaliação sobre a influência dos sanitizantes na firmeza dos tomates.

A cutícula no tomate, estruturalmente consiste em uma membrana formada por uma bicamada, (externa e interna), em que a parte externa da bicamada está formada por lipídeos alifáticos e a interna por polissacarídeos, .

A maior perda de firmeza foi para o tratamento com DET, isto pode estar relacionada a que DET possui, boa capacidade detergente que facilita a remoção dos lipídeos alifáticos que conformam a camada externa, da cutícula, diminuindo a barreira protetora da cutina, essas alterações na cutícula são parte integrante do amadurecimento, que poderia ter sido precocemente estimulado, pela ação do detergente (DET), (SALADIE *et al.*, 2007).

É provável que o DET tenham influenciado na atividade dessas enzimas, iniciando-se todo o processo pela remoção das ceras cuticulares, o que faz que o tomate perca água a maior rapidez, isto faz que a respiração se incremente e

a produção de etileno seja maior. O etileno está relacionado com a atividade enzimática, para ativar o amadurecimento (SHOUTEN *et al.*, 2007).

Chiumarrelli e Ferreira, (2006) reportaram a que a presença da ceras influencia a resistência da película do tomate mantendo a textura do fruto, e observaram uma diferença entre os valores de firmeza de até 10%, a favor do tomate encerado respeito do controle. Similar comportamento foi observado por Hoa et al. (2002) em mangas enceradas.

A perda da firmeza está relacionada com a atividade das enzimas poligiaracturonase e metilesterase, e ambas diretamente associado à atividade do etileno, hormônio responsável por ativar o processo de amadurecimento e senescência em frutos de tomate (CHOI *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2015).

No caso do tratamento BAC, ao ser um tensoativo catiônico, ele pode ter formado um filme de recobrimento na superfície do tomate, o sendo que a firmeza foi próxima do controle (água).

Tabela1. Valores de firmeza, expressos em N, dos tomates tratados com sanitizantes durante o armazenamento

Dia	Firmeza (N)				% Redução da firmeza			
	Água	DCICNA	BAC	DET	Água	DCICNA	BAC	DET
0	17,74±1,56	22,72±1,24	17,95±1,07	19,65±0,69	-	-	-	-
3	14,65±2,12	19,85±1,90	13,27±1,62	19,05±1,58	17,42	12,63	26,06	3,06
6	16,25±1,68	16,31±2,62	18,58±2,73	15,29±1,44	8,40	28,19	-3,55	22,21
9	13,35±1,38	17,30±1,49	13,83±1,43	13,76±1,34	24,76	23,85	22,93	29,96
12	10,58±1,36	12,49±0,88	12,73±2,10	13,59±1,5	40,36	45,02	29,07	30,85
15	13,70±1,07	15,09±1,05	11,60±1,39	11,06±1,4	22,79	33,56	35,35	43,71
18	13,69±1,62	9,18±0,93	11,11±0,88	8,51±1,47	22,86	59,58	38,11	56,70
21	9,51±0,36	9,77±1,63	9,67±1,86	7,61±1,16	46,43	57,00	46,13	61,26

Medias e desvio padrão. Redução de firmeza (Relação entre o valor médio da firmeza da amostra no dia da avaliação / a média da amostra no dia zero).

4.6. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS TOMATES

Na Tabela 2, são apresentados os resultados da análise microbiológica das amostras de tomates utilizados no experimento sobre a ação antimicrobiana dos tratamentos com BAC, DET e DCICNA, além do controle. Os grupos microbianos indicadores de qualidade higiênica, ou seja, mesófilos aeróbios, *Pseudomonas* spp., bactérias lácticas; fungos filamentosos e leveduras apresentaram contagens dentro do esperado para vegetais *in natura*. Ainda, foi constatada a ausência de *Salmonella* spp. e os valores de *E. coli* encontravam-se dentro das exigências da legislação, para hortaliças *in natura*, de acordo com Anvisa, (ANVISA, 2001).

Tabela 2. Microbiota presente no tomate cv. tipo italiano antes da sanitização

Micro-organismos	Tomate tipo Italiano
	Log UFC/g
Mesófilos aeróbios	2,4 ± 0,1
<i>Pseudomonas</i> spp.	1,7 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i>	0,1 ± 0,1
Bactérias Lácticas	< 2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5 ± 0,2
Fungos e leveduras	2,0 ± 0,1
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência / 25 g

Os valores representam as medias e os desvios padrão.

No tempo de armazenamento zero dias, (Tabela 3), as contagens de mesófilos aeróbios e fungos e leveduras em tomates, após a sanitização foram reduzidos ($P \leq 0.05$) pelos tratamentos com DCICNA, BAC e DET com relação ao controle. Dentre os tratamentos aquele que teve menor eficiência foi o DET diminuindo a contagem de mesófilos em 0,5 log (UFC/g), e o mais eficiente foi o BAC que reduziu-o a contagem em 1,9 log (UFC/g), (Tabela 3).

O tratamento DET, apresenta uma baixa eficiência na sua atividade bactericida, resultados similares foram reportados por (BRILHANTE *et al.*, 2013) entre tanto Costa, et al. (2012) avaliaram o uso do DET, na superfície de alface e obtiveram uma diminuição na contagem *E. coli*, de aproximadamente 2

ciclos log(UFC/g) presentes nas folhas de alface avaliadas, este resultado foi maior que o encontrado neste trabalho, para a redução de mesófilos aeróbios.

Com o tratamento BAC, foram obtidos quase dois ciclos log (UFC/g), entre tanto Velazques et al. (2009) reduziram até 4,21 ciclos log(UFC/g) de *Yersiniaenterocolítica*, na superfície de alface.

Os tratamentos tiveram atividade na redução dos fungos e leveduras. O melhor resultado obteve-se com o (BAC), seguido do DCICNA e do DET. Este último foi o que teve a menor eficiência entre todos os tratamentos, (Tabela 3).

Tabela 3. Logaritmo de UFC/g mesófilos aeróbios e fungos e leveduras em tomates após a sanitização nos dias zero e 21 de armazenamento.

Micro-organismos	Tratamento			
	Água.	DCICNA	BAC	DET
Dia zero de conservação				
Mesofilos aeróbios	2,4 ± 0,21a	0,61 ± 0,18b	0,5 ± 0,13 b	1,5 ± 0,47a
Fungos e leveduras	2,0 ± 0,7a	1,1 ± 0,3ab	0,9 ± 0,31ab	1,6 ± 0,2ab
Dia 21 de conservação				
Mesofilos aeróbios	3,8 ± 0,8a	3,2 ± 0,7a	3,1 ± 0,9a	3,6 ± 0,4a
Fungos e leveduras	3,7 ± 0,5a	3,3 ± 0,5a	3,0 ± 0,7a	3,5 ± 0,4a

Letras iguais nas fileiras não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As siglas correspondem a DCICNA (dicloroisocianurato de sódio), BAC (cloreto de benzalcônio), DET (Detergente comercial, a base de tensoativos)

O BAC, atua sobre as membranas dos esporos, bloqueando o intercâmbio de nutrientes entre o meio e os esporos, o que leva a lise da célula. Outro mecanismo que explica a atividade fungicida do BAC é através da lipofilia da sua cadeia alquilica, que se insere na membrana do esporo até danificá-la, (GUIQIANet *et al.*, 2007).

O DCICNA, na concentração utilizada têm baixa atividade sobre os fungos, o que explica sua baixo desempenho, (Tabela 3).

A influência do tratamento com DET, na diminuição de esporos, poderia ser devida à propriedade tensoativa do DET, que pode ter alterado a interação

superfície de tomate/superfície do esporo, o que poderia ter facilitado a remoção do esporo da superfície da fruta no processo de sanitização, diminuindo a probabilidade da presença dos esporos e sua consequente germinação sobre o fruto durante o período de armazenamento.

No período final de conservação dia 21 (Tabela 3), as diferenças encontradas na contagem de mesófilos aeróbios do dia zero, e a contagem de fungos filamentosos e leveduras se perderam no dia 21, verificando-se o efeito temporário do DCICNA e BAC com a perda da atividade bactericida em função do tempo.

5. CONCLUSÃO

Ao final do período de armazenamento de 21 dias do tomate italiano, as características acidez, SST, Ratio (°Brix/acidez) e firmeza foram pouco influenciados pelos tratamentos, com BAC e BAC + ETB e DCICNA.

O tratamento DET, foi o que mais alterou as características físico-químicas, em detrimento da qualidade da conservação do tomate. Os tratamentos com cloreto de benzalcônio e com o dicloroisocianurato de sódio, foram os que tiveram menor influência nas características físico-químicas em relação ao controle (água).

A qualidade microbiológica inicial do tomate foi boa indicado pelos valores das contagens de log (UFC/g) no tempo zero dias de conservação. Todos os micro-organismos controle (*Escherichia coli* e *Salmonella sp.*) apresentaram-se dentro o exigido pela normativa da ANVISA para hortaliças *in natura*.

Após os tratamentos de sanitização do tomate, a população de micro-organismos foi diminuída, no máximo em dois ciclos log de UFC/g no dia zero em relação ao controle. Entre tanto ao final do período de conservação as análises microbiológicas para os tomates com tratamento, apresentaram-se próximas as avaliadas sobre o controle no tempo 21 dias, evidenciando a falta de residualidade de todos os compostos avaliados na sanitização, do tomate.

6. REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 16. Ed. Washington, DC., 1997.

ANJOS VD, ZANINI JS, ABRAHÃO RMS, CASTRO MFP, VALENTIN SR. Monitoramento da maturação pós-colheita de tomate verde maduro dos grupos italiano “Pizzadoro” e saladete “Alambra”. **Journal of Fruits and Vegetables**, v. 1, n. 1, p. 53-60, 2015.

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

BATU, A. Determination of acceptable firmness and colour values of tomatoes; **Journal of Food Engineering** v.61, p.471–475, 2004.

BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M. A., Yeast and molds. In: DOWNES, F.P., and K. ITO (ed.) Compendium of Methods for the microbiological Examination of Foods, 4th ed. **American Public Health association**, Washington. D.C., Chapter 20, p. 209 – 215, 2001.

BRUMMELL, D.A., HARPSTER, M.H., Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* v. 47, p.311–340, 2001.

CANTWELL, M. Fresh Market Tomato Statewide Uniform Variety Trial Report Field na **Postharvest evaluations**, University of California, South San Joaquin Valley, C.A. 2004.

COSTA, E.A.; FIGUEREDO, E.A.T.; CHAVES, C.S.; ALMEIDA, P.C.; VASCONCELOS, N. M.; MAGALHÃES, E.S., I.M.C.; MORAES, A.I. PAIXÃO, L.M.N., Avaliação Microbiológica de Alfaves (*Lactuca Sativa* L.) convencionais e orgânicas e a eficiência de sanitização de dois processos de Higienização. **Alimentos e Nutrição** v.23, p. 387 -392, 2012.

CLÉMENT A, DORAIS M, VERNON M. Multivariate Approach to the Measurement of Tomato Maturity and Gustatory Attributes and Their Rapid Assessment by Vis-NIR Spectroscopy **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p.1538–1544, 2008

CHITARRA, M.I. F; CHITARRA, A. B., Pós-colheita de frutas e hortaliças fisiologia e manuseio 2ª edição Lavras: UFLA, p.785, p.2005.

CHOI, S.T.; HUBER, D.J.; KIM, J.G.; HONG, Y.P.; Influence of chlorine and mode of application on efficacy of aqueous solutions of 1-methylcyclopropene in delaying tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology** v. 53; p.16–21, 2009.

CHIUMARELLI, M.; FERREIRA, M.D.; Qualidade pós-colheita de tomates Débora com utilização de diferentes coberturas comestíveis e temperaturas de armazenamento. **Horticultura Brasileira**, v.24, p. 381-385, 2006.

FILGUEIRA, F. A. R. Solanáceas II – **Tomate: a hortaliça cosmopolita**. In: Novo manual de olericultura: **Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**.3. ed. Viçosa, MG: UFV. p. 194-241. 2008.

GIORDANO, L. B.; RIBEIRO CS da. Origem botânica e composição química do fruto. In: SILVA J. B. C. da; GIORDANO L. B. (Orgs.) Tomate para o processamento industrial. Embrapa Brasília DF: Comunicação para transferência de Tecnologia/ **EmbrapaHortaliças**. p. 36-59, 2000.

GUIQIAN, L. G.; WU, D.; FU, R., Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylamino ethylmethacrylate, **Reactive & Functional Polymers**, v. 67, 355–366, 2007.

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

KADER, A.A., Flavor quality of fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agric**. v. 88, p. 1863–1868, 2008.

KHAIRI, A.N.; FALAH, M.A.F.; SUYANTOHADI, N.; TAKAHASHI, H. NISHINA, Effect of Storage Temperatures on Color of Tomato Fruit (*Solanum lycopersicum* Mill.) Cultivated under Moderate Water Stress, Treatment, Agriculture and **Agricultural Science Procedia**, v.3, p. 178 – 183, 2015.

KORNACKI, J.L e JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In. DOWNES, F.P., AND K..ITO (Ed.). Compendium of Methods for the microbiological examination of foods 4a ed. American Public. Health**Association**, Chapter 8, p. 69 – 82. Washington, D.C., 2001.

LOPEZ CAMELO, A. F.; GOMEZ, P.A. Comparison of color indexes for tomato ripening. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v.22, n.3, p.534-537, maio/jun. 2004.

MAJIDI H, MINAEI S, ALMASI M, MOSTOFI Y. Total Soluble Solids, Titratable Acidity and Repining Index of Tomato In Various Storage Conditions. **AustralianJournal of Basic and Applied Sciences**, v.5, n 12, p. 1723-1726, 2011

MISSIO JC, RENAUM RM, ARTIGAS FC, CORNEJO JC. Sugar-and-acid profile of Penjar tomatoes and its evolution during storage.**Scientia Agricola**, v;72, n 4, p.314-321, 2015

RAUPP D.S., GARDINGO R.G., SCHEBESKI S., AMADEU C.A.; BORSATO, Processamento de tomate seco de diferentes cultivares, *Acta Amazônica*, v. 39 n 2, p. 415 – 422; 2009.

RONG Z, LING JF, MEI L, TAO Z, JUAN LX, SHEN W. Quantitative analysis of lycopene content in tomato fruit by using colorimeter method. *Acta Agriculturae Jiangxi*. v.24, n 9, p. 45-48, 2012.

SCHOUTEN, R. E.; NATALINO A.; TIJSKENS, L.M.M.; WOLTERING E.J.; VAN KOOTEN, O. Modelling the firmness behaviour of cut tomatoes, **Postharvest Biology and Technology**, v.57, p. 44–51, 2010.

SCHOUTEN, R.E.; HUIJBEN, T.P.M.; TIJSKENS, L. M.M.; VAN KOOTE, Modelling quality attributes of truss tomatoes: Linking colour and firmness maturity, **Postharvest Biology and Technology** v.45, p. 298–306, 2007.

SILVA, S.J.; FINGER, L.F.; CORREA, L.P. Armazenamento de Frutas e Hortaliças, 2005. Capítulo de livro.

VINHA, A.F.; BARREIRA, S.B.P, COSTA, A.S.G.; ALVES, R.C.; OLIVEIRA, MV.V.P., Organic versus conventional tomatoes: Influence on physicochemical parameters, bioactive compounds and sensorial attributes, **Food and Chemical Toxicology**, v. 67, p.139–144, 2014.

TAMURA H, KNOCH M, HAYASHI Y, BUKOVAC MJ. Selective Solubilization of Tomato Fruit Epicuticular Wax Constituents by Triton X-100 Surfactant. **J. Pesticide Sci.** v; 26, p.16-20, 2001.

PETIT J, BRES C, JUST D, GARCIA V, MAUXION JP, MARION D, BAKAN B, JOUBÈS J, DOMERGUE F, ROTHAN C. Analyses of Tomato Fruit Brightness Mutants Uncover Both Cutin-Deficient and Cutin-Abundant Mutants and a New Hypomorphic Allele of GDSL Lipase. **Plant Physiology**, v. 164, p. 888–906, 2014.

VENSKÉ C., DOS SANTOS J., RAUPP D.S, GARDINGO, A., BORSATO V., Influência do grau de maturação nas características sensoriais de tomate seco envasado em óleo. Pub. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., **Ponta Grossa**, v.10, n 3, p.33-40, 2004.

VOGG G, FISCHER S, LEIDE J, EMMANUEL E, JETTER R, LEVY AA, RIEDERER M. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 401, p. 1401-1410, June 2004.

KHAIRI AN, FALAH MAF, SUYANTOHADIA A, TAKAHASHI N, NISHINAB H. Effect of Storage Temperatures on Color of Tomato Fruit (*Solanum lycopersicum* Mill.) Cultivated under Moderate Water Stress Treatment **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. v.3 p.178 – 183, 2015.

PINHEIRO, J.; ALEGRIA, C.; ABREU, M.; GONÇALVES, E.M.; SILVA, C. L.M., Influence of postharvest ultrasounds treatments on tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Zinac), **Ultrasonics Sonochemistry**, v.27 p, 552-559, 2015.