



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

RAQUEL TAYNAN CUNHA VIEIRA

APLICAÇÃO DE PLASMA FRIO POR DESCARGA LUMINOSA NA INATIVAÇÃO
DE *Salmonella Entérica* E *Escherichia coli* EM AGRIÃO (*Nasturtium officinale* R. Br)

FORTALEZA

2026

RAQUEL TAYNAN CUNHA VIEIRA

APLICAÇÃO DE PLASMA FRIO POR DESCARGA LUMINOSA NA INATIVAÇÃO DE
Salmonella Entérica E *Escherichia coli* EM AGRIÃO (*Nasturtium officinale* R. Br)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA

2026

RAQUEL TAYNAN CUNHA VIEIRA

APLICAÇÃO DE PLASMA FRIO POR DESCARGA LUMINOSA NA INATIVAÇÃO
DE *Salmonella Entérica* E *Escherichia coli* EM AGRIÃO (*Nasturtium officinale* R. Br)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 23/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Profa. Dra. Ana Lúcia Fernandes Pereira
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

A Deus. A minha mãe Rozângela e meu pai
Luís (*in memoriam*) que por muito me amarem,
sempre me permitiram voar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de força, sabedoria e propósito, por sustentar cada etapa desta caminhada e permitir a concretização deste trabalho. A Ele sejam dirigidas toda honra e gratidão.

À minha família, pelo amor incondicional, apoio constante e incentivo ao longo de toda a trajetória acadêmica em especial a minha mãe Rozângela e meus irmãos Louana, Rosana, Leonardo e Leandro que foram meu alicerce durante toda essa trajetória. A confiança depositada e o suporte oferecido foram fundamentais para que este objetivo fosse alcançado. Esta conquista também lhes pertence.

Agradeço ao meu noivo Henrique Júnior por todo o suporte ao longo dessa trajetória. Seu apoio e presença foram essenciais e indispensáveis.

À orientação acadêmica recebida da professora Dra. Sueli Rodrigues pela dedicação, paciência, confiança e rigor científico, que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa e para minha formação profissional.

Aos professores e pesquisadores que contribuíram com discussões, sugestões e colaborações científicas relevantes, bem como aos membros da banca examinadora professora Dra. Ana Lúcia e professor Dr. Pedro Campelo, pela disponibilidade e pelas valiosas considerações que enriqueceram este estudo.

Ao grupo de pesquisa e à equipe do laboratório (LABIOTEC), pelo ambiente colaborativo, pelo auxílio nos experimentos e pela convivência diária, que tornaram o percurso acadêmico mais leve e enriquecedor. Em especial, agradeço as minhas amigas Elaine, Fátima, Sannara e Karoline que foram essenciais principalmente nos dias de suporte científico e emocional. Também agradeço a Dr. Thatyane por sempre oferecer suporte científico nos experimentos.

Agradeço também aos meus amigos Damicléa, Jorge e Diogo que enfrentaram as dificuldades nas disciplinas durante o mestrado, vocês foram essenciais para que os trabalhos fossem cumpridos e entregue com a qualidade e rigor necessário.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para a conclusão de uma etapa significativa da minha formação acadêmica.

RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia do plasma frio por descarga luminosa na inativação de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Escherichia coli* inoculadas em agrião (*Nasturtium officinale* R.Br.), bem como investigou os efeitos do tratamento sobre a viabilidade celular, a estabilidade microbiológica durante o armazenamento refrigerado e as alterações morfológicas induzidas nos microrganismos. O plasma foi aplicado sob diferentes condições operacionais, variando-se o fluxo de gás (10, 20 e 30 mL/min) e o tempo de exposição (10, 15 e 20 min). A sobrevivência microbiana foi monitorada ao longo do armazenamento refrigerado por meio de contagens em meios seletivos. Adicionalmente, a viabilidade celular residual foi avaliada pelo ensaio de MTT, e os danos estruturais foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados demonstraram que o plasma frio promoveu inativação significativa dos patógenos, sendo observada inativação completa de *E. coli* e *S. Typhimurium* no agrião sob as condições mais eficazes, correspondendo a F10T20, F20T20 e F30T20 para *E. coli* e F10T10, F10T15 e F20T10 para *S. Typhimurium*. Tratamentos intermediários também resultaram em reduções significativas ($p < 0,05$). Quando suspensões microbianas foram tratadas isoladamente, a inativação total foi alcançada em todas as condições avaliadas. O ensaio de MTT confirmou uma perda substancial da atividade metabólica, com valores residuais variando de $7,68 \pm 0,38\%$ a $1,60 \pm 0,72\%$ para *E. coli* e de $17,71 \pm 0,94\%$ a $1,46 \pm 0,39\%$ para *S. Typhimurium*, apresentando redução progressiva ao longo de 72 h de armazenamento. As imagens de MEV evidenciaram danos morfológicos pronunciados, incluindo encolhimento celular, aumento da rugosidade superficial, fissuras na membrana e colapso estrutural das células bacterianas. Tais alterações são compatíveis com mecanismos de inativação associados ao estresse oxidativo e à disrupção da membrana celular promovidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas durante a descarga de plasma. De modo geral, os resultados indicam que o plasma frio por descarga luminosa constitui uma tecnologia não térmica promissora para o controle de *S. Typhimurium* e *E. coli* em hortaliças folhosas, com potencial aplicação como estratégia alternativa de descontaminação de vegetais frescos.

Palavras-chave: descarga luminosa; inativação; hortaliça; segurança alimentar; tecnologia não térmica.

ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of cold plasma generated by glow discharge for the inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* inoculated in watercress (*Nasturtium officinale* R.Br.), as well as to investigate its effects on cellular viability, microbiological stability during refrigerated storage, and plasma-induced morphological alterations. Plasma treatments were carried out under different operational conditions, varying gas flow rates (10, 20, and 30 mL/min) and exposure times (10, 15, and 20 min). Microbial survival was monitored throughout refrigerated storage by selective plate counts. Residual cellular viability was assessed using the MTT assay, and structural damage was examined by scanning electron microscopy (SEM). The results demonstrated that cold plasma treatment promoted significant pathogen inactivation, with complete elimination of cultivable *E. coli* and *S. Typhimurium* in watercress under the most effective conditions, which were F10T20, F20T20 and F30T20 for *E. coli* and F10T10, F10T15 and F20T10 for *S. Typhimurium*. Intermediate treatments also resulted in significant reductions ($p < 0.05$). When microbial suspensions were treated independently of the food matrix, total inactivation was achieved under all evaluated conditions. The MTT assay confirmed a substantial loss of metabolic activity, with residual viability ranging from $7.68 \pm 0.38\%$ to $1.60 \pm 0.72\%$ for *E. coli* and from $17.71 \pm 0.94\%$ to $1.46 \pm 0.39\%$ for *S. Typhimurium*, showing a progressive decrease over 72 h of refrigerated storage. SEM images revealed pronounced plasma-induced morphological damage, including cell shrinkage, increased surface roughness, membrane fissures, and structural collapse of bacterial cells. These effects are consistent with oxidative membrane disruption driven by reactive oxygen and nitrogen species generated during plasma discharge. Overall, the findings demonstrate that cold glow discharge plasma is an effective non-thermal intervention for the control of *S. Typhimurium* and *E. coli* in leafy vegetables, highlighting its potential application as an alternative decontamination strategy for fresh produce.

Keywords: food safety; glow discharge; inactivation; non-thermal technology; vegetable.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Microrganismos	12
2.1.1	<i>Salmonella spp.</i>	12
2.1.2	<i>Salmonella Typhimurium</i>	13
2.1.3	<i>Escherichia coli</i>	13
2.2	Agrião (<i>Nasturtium officinale R.Br.</i>)	14
2.3	Tecnologias Térmicas e Sanitizantes	16
2.4	Tecnologias não térmicas	17
2.4.1	<i>Plasma Frio</i>	17
2.4.1.1	<i>Aspectos Gerais da Tecnologia Plasma Frio</i>	17
2.4.1.2	<i>Aplicação em Alimentos</i>	20
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Obtenção e preparo do estoque das cepas microbianas	24
4.1.1	<i>Preparação do inóculo de S. Typhimurium</i>	24
4.1.2	<i>Preparação do inóculo de E.coli</i>	24
4.1.3	<i>Obtenção das suspensões microbianas padronizadas</i>	24
4.2	Preparo do agrião (<i>N. officinale</i>) e inoculação das cepas	25
4.3	Processamentos não térmicos	26
4.3.1	<i>Aplicação do plasma frio de descarga luminosa para inativação de S. Typhimurium e E.coli inoculadas em agrião</i>	26
4.3.2	<i>Aplicação do plasma frio de descarga luminosa para inativação das suspensões de S. Typhimurium e E.coli</i>	28
4.4	Análises Microbiológicas	28
4.4.1	<i>Enumeração de bactérias</i>	28
4.4.2	<i>Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT</i>	29
4.4.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	30
4.5	Análise Estatística	30

4.6	Modelagem cinética	31
4.6.1	<i>Modelo Weibull</i>	31
4.6.2	<i>Modelo Peleg-Corradini</i>	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Redução microbiana de <i>E. coli</i>	33
5.2	Redução microbiana de <i>S. Typhimurium</i>	36
5.3	Aplicação de um modelo matemático para explicar a eficiência de inativação durante o tratamento com plasma de descarga luminosa	39
5.3.1	<i>E. coli</i>	39
5.3.2	<i>S. Typhimurium</i>	41
5.4	Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT	44
5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	46
5.5.1	<i>E.coli</i>	46
5.5.2	<i>S. Typhimurium</i>	48
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos representam um grave problema de saúde pública mundial, sendo responsáveis por milhões de casos de enfermidade e mortes todos os anos. Estima-se que, anualmente cerca de 48 milhões de casos de doenças transmitidas por água e alimentos (DTHA) ocorrem nos Estados Unidos (CDC, 2025). Apenas na Europa, estima-se que mais de 23 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente, resultando em cerca de 5.000 mortes relacionadas ao consumo de alimentos contaminados, principalmente por produtos de origem animal e hortaliças consumidas cruas (CDC, 2024a; Subrahmanyam et al., 2024; Nurjayadi et al., 2019). No Brasil, embora os números sejam menores, cerca de 156 mil pessoas são afetadas anualmente por doenças transmitidas por água e alimentos. Entre os patógenos de maior relevância estão *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, amplamente associados a surtos de infecção alimentar e à contaminação de vegetais folhosos (Heredia e García, 2018; Melo, de et al., 2021).

As bactérias *E. coli* e *Salmonella* spp. são bacilos gram-negativas e estão normalmente associadas à contaminação fecal-oral (McCoy Sanders et al., 2024). Embora maior parte dos sorotipos de *E. coli* sejam consideradas não patogênicas, cepas patogênicas como *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) são capazes de causar doenças gastrointestinais severas (Heybet et al., 2024; Rani et al., 2021).

Estas bactérias são capazes de contaminar os alimentos de diversas formas, como nas instalações de processamento de alimentos, podendo ocorrer por meio água, matérias-primas e ingredientes contaminados, roupas e sapatos de funcionários, superfícies de contato e pela existência de pragas (McCoy Sanders et al., 2024).

Quando presentes em condições ideais de atividade de água, umidade, pH e temperatura, as bactérias possuem a capacidade de formar biofilmes. Os biofilmes possuem habilidades para se fixar em superfícies e criar uma barreira protetora, tornando as bactérias mais resistentes à limpeza e higienização aplicada nas indústrias, e com isso, contribuem para o aumento da probabilidade de contaminação dos alimentos (Zhu et al., 2022).

Os vegetais in natura e minimamente processados estão entre os alimentos que podem atuar como veículos de transmissão desses patógenos, apresentando um envolvimento cada vez mais frequente em surtos de origem alimentar (Alves et al., 2024). Vegetais minimamente processados são aqueles que, embora permaneçam frescos, passam por etapas como lavagem, descascamento, corte, sanitização, embalagem e armazenamento, visando facilitar o consumo sem comprometer suas características naturais (Ramos et al., 2013).

Dentre os vegetais, pode-se destacar o agrião (*Nasturtium officinale* R. BR.) que é um microverde com propriedades nutricionais e biológicas importantes e amplamente conhecidas. Dentre as propriedades, o agrião se destaca por sua elevada concentração de compostos bioativos, entre os quais se destacam os glucosinolatos, isotiocianatos, especialmente o fenetil-isotiocianato, um composto comumente associado à atividade anticarcinogênica. Além disso, contém flavonoides, carotenoides, ácidos fenólicos, e compostos sulfurados voláteis que contribuem para seu aroma e propriedades antimicrobianas (Klimek-Szczykutowicz et al., 2018).

Do ponto de vista microbiológico, o agrião (*Nasturtium officinale*) é uma hortaliça frequentemente consumida crua, o que aumenta o risco de contaminação por microrganismos patogênicos. De acordo com o Sistema Nacional de Relatórios de Surtos do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) identificou os principais patógenos transmitidos por alimentos associados a surtos causados por brotos e a recolhimentos voluntários envolvendo microverdes. Entre os mais comuns estão: *Listeria monocytogenes*, Norovírus, *Salmonella* e *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga. A origem dessa contaminação geralmente está relacionada à irrigação com água contaminada, manuseio inadequado ou ausência de boas práticas agrícolas (Rao et al., 2025).

Objetivando garantir a oferta de produtos de qualidade e com uma maior vida de prateleira, as indústrias aplicam agentes químicos ou tecnologias térmicas para reduzir a carga microbiana de alimentos. Ambos tratamentos são considerados métodos importantes para preservação garantindo a estabilidade dos alimentos, porém dos agentes químicos tradicionalmente utilizados para sanitização não promovem uma redução microbiana suficientemente eficaz e ainda são alvo de críticas por parte dos consumidores, devido a sua potencial toxicidade à saúde humana e aos impactos ambientais adversos que podem causar (Pinela et al., 2016). Paralelamente, os tratamentos térmicos convencionais, embora sejam eficazes na inativação microbiana, tendem a comprometer importantes atributos de qualidade dos alimentos, como textura, cor, sabor e valor nutricional, principalmente de vegetais folhosos (Bezerra et al., 2023).

As tecnologias não térmicas emergentes surgem como alternativas aos processos térmicos, promovendo uma mudança promissora na melhoria da qualidade de alimentos. Essas tecnologias vêm demonstrando capacidade de inativar ou diminuir a carga microbiana de patógenos a nível seguros para consumo, retenção de nutrientes, melhoria nos atributos sensoriais, contribuindo para um meio ambiente mais sustentável (Niveditha et al., 2021). Além disso, a adoção dessas abordagens está em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento

Sustentável (ODS) das Nações Unidas, em particular o ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar) e o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), reforçando sua relevância na promoção tanto da segurança alimentar quanto da sustentabilidade (Fernandes e Rodrigues, 2024). Dentre as tecnologias pode-se destacar o plasma frio em suas diversas configurações (Lopes, S. Sant'Ana e Freire, 2023).

O plasma consiste em um gás que pode ser parcial ou totalmente ionizado contendo em sua composição espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, radiação ultravioleta (UV), radicais livres, e partículas carregada. O plasma frio é um processo induzido por descargas elétricas que nos últimos anos vem atraindo o interesse da indústria de alimentos por possuir a capacidade de operar sob baixa pressão e baixas temperaturas (Laroque et al., 2022;Chizoba Ekezie et al., 2017)

O plasma de descarga luminosa é gerado em uma câmara de vácuo, onde um gás é continuamente introduzido. A ionização ocorre através da aplicação de alta tensão entre dois eletrodos, formando íons e elétrons que sustentam o plasma. Fontes de energia de alta frequência mantêm o processo, enquanto a bomba de vácuo garante fluxo constante e estabilidade do sistema. Em particular, oferece vantagens como baixa temperatura de operação, estabilidade do campo elétrico e penetração uniforme na superfície dos vegetais, tornando-se uma abordagem promissora para produtos frescos(Galaly e Dawood, 2024).

O plasma frio tem sido objeto de estudo para inativação de microrganismos patógenos em várias matrizes alimentares, incluindo de origem vegetal, sem comprometer significativamente a qualidade sensorial e o valor nutricional dos alimentos. Isso é importante visto que os métodos tradicionais de processamento térmico podem causar perda de nutrientes significativas e alterações nas características sensoriais podendo causar a rejeição dos alimentos por parte dos consumidores (Bezerra et al., 2023).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos

As doenças de origem alimentar (infecção, intoxicação e toxinfecção) são desenvolvidas através da ingestão de alimentos ou bebidas com a presença de microrganismos viáveis, de seus esporos ou de suas toxinas. Tais doenças estão relacionadas com os fatores de virulência (Nurjayadi *et al.*, 2019).

Logo, a virulência refere-se à capacidade de um microrganismo causar dano significativo ao hospedeiro, sendo influenciada por fatores bioquímicos, metabólicos e estruturais que determinam sua eficiência em colonizar, invadir e se multiplicar nos tecidos. Entre os principais determinantes de virulência estão a capacidade de aderir às células do hospedeiro, invadir tecidos e evadir mecanismos de defesa. Esses processos são especializados e regulados por ilhas de patogenicidade, que codificam sistemas de secreção, proteínas efetoras e fatores que facilitam a sobrevivência intracelular e a disseminação sistêmica. (Fardsanei *et al.*, 2018; Morasi *et al.*, 2022)

Salmonella spp. e *Escherichia coli* destacam-se como microrganismos significativos responsáveis por causar doenças e morte em todo o mundo (Heredia e García, 2018). Esses microrganismos têm sido detectados em diversos alimentos e a indústria por sua vez, movimenta-se para adotar métodos eficazes objetivando aumentar a segurança e prolongar a vida útil dos alimentos (Olatunde, Shiekh e Benjakul, 2021; Subrahmanyam *et al.*, 2024).

2.1.1 *Salmonella* spp.

A *Samonella* spp. é considerada um patógeno comum que pode ser transmitido por alimentos causando infecção alimentar e colite em seres humanos. Sorovares de *Salmonella* são capazes de se espalhar e infectar através de alimentos para humanos, causando enormes prejuízos à segurança alimentar e à saúde pública (Sodagari *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023).

Salmonella spp. são bacilos gram-negativos geralmente móveis que pertencem à família *Enterobacteriaceae* (Silva *et al.*, 2024). Há aproximadamente 2500 sorotipos de *Salmonella* enterica, baseados nos antígenos O e H, dentre elas, 2000 podem infectar seres humanos causando sintomas brandos até doenças mais graves (Sodagari *et al.*, 2020).

Infecções por *Samonella* spp. (salmonelose) podem causar comorbidades severas e até morte não apenas em países subdesenvolvido, mas também em países desenvolvidos.

Recentemente, estudos reportam registros de surtos de infecção por *Samonella* Typhimurium na Europa sendo a causa associada a produtos de chocolate (Korkeala, Koskela e Jalava, 2024; Wang et al., 2023).

A contaminação por *Salmonella* spp. ainda prevalece em alimentos de origem animal, principalmente em aves, carnes cruas, ovos e seus produtos (Sun *et al.*, 2021). Mas também pode ocorrer contaminação desta bactéria em alimentos de origem vegetal (CDC, 2024b; Melo, de et al., 2021). A *Salmonella* spp. são patógenos responsável por causar centenas de milhões de infecções em todo o mundo, resultando em 100 milhões de casos aproximadamente de gastroenterite. Além disso, cerca de 80% das doenças estão associadas a alimentos contaminados por *Salmonella* spp. (Xu et al., 2024).

2.1.2 *Salmonella Typhimurium*

Os sorovares Typhimurium (*S. Typhimurium*) e Enteritidis (*S. Enteritidis*) pertencentes ao grupo das *Salmonella enterica* não tifoides e configuram-se como os principais agentes etiológicos de salmonelose em humanos. Estimativas a nível global apontam que as infecções não tifoides resultam em aproximadamente 93 milhões de casos anuais de gastroenterite e cerca de 155.000 mortes por ano, evidenciando sua relevância epidemiológica (Shaji, Selvaraj e Shanmugasundaram, 2023).

A manifestação clínica da doença pode variar de gastroenterites mais simples a quadros graves, dependendo de fatores como sorovar envolvido, idade, condição imunológica e estado nutricional do hospedeiro. A literatura descreve que a dose infectante para lactentes pode ser extremamente baixa, na ordem de 10^2 células bacterianas, sendo ainda inferior em indivíduos imunocomprometidos, o que reforça o elevado potencial de risco associado a este patógeno, mesmo em contaminações de baixa intensidade em alimentos frescos (Fàbrega e Vila, 2013; Shaji, Selvaraj e Shanmugasundaram, 2023).

2.1.3 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria indicadora de contaminação fecal devido a sua prevalência em fezes de humanos e animais que compreende um grupo de bactérias gram-negativas pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Fermentadora da lactose, suas células possuem formas de bacilos, podendo ser imóveis ou móveis (Heredia e García, 2018; Chen et al., 2024).

Ainda que algumas cepas de *E.coli* sejam consideradas benignas, há existência de variantes patogênicas que causam graves doenças, apresentando risco para população. Dentre as cepas patogênicas, com base em seus fatores de colonização e mecanismos de virulência, pode-se destacar: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* aderente difusiva (DAEC) (Heybet et al., 2024).

Dentre as *E.coli*, a (STEC) tornou-se um dos principais patógenos transmitido por alimentos e água. Esta bactéria produz uma toxina denominada toxina Shiga que é responsável por 20% dos casos de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. Estudos relatam que a *E.coli* O157:H7 pode resultar em diarreia com sangue e até doenças graves como colite hemorrágica, púrpura trombocitopenia trombótica e falência permanente de órgãos. Seu alto potencial de patogenicidade e capacidade letal torna-se uma ameaça para saúde humana, sendo uma preocupação de grande magnitude para saúde pública em todo o mundo (Rani et al., 2021; Zhao et al., 2024).

2.2 Agrião (*Nasturtium officinale* R.Br.)

O agrião (*N. officinale*) é uma planta pertencente à família *Brassicaceae*, originária da Ásia e da Europa. Caracterizada por caules rastejantes ou flutuante, irregulares e com comprimento variando entre 10 a 60 cm, suas folhas são de coloração verde-escura, enquanto a inflorescência é composta por flores pequenas, brancas, com quatro pétalas. Tradicionalmente utilizado na alimentação humana em diferentes áreas da culinária como em sopas, pratos de carne, massas e também em salada, assim como na medicina popular. O agrião tem despertado crescente interesse da comunidade científica devido à sua composição fitoquímica e aos seus múltiplos potenciais (Klimek-Szczykutowicz; Szopa; Ekiert, 2018).

Do ponto de vista nutricional e funcional, o agrião é uma fonte relevante de glucosinolatos, flavonoides, polifenóis, vitaminas (A, C, E e do complexo B) e minerais (ferro, cálcio, potássio, zinco). Os glucosinolatos, em particular, são precursores de isotiocianatos compostos bioativos com reconhecida ação antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. A presença de flavonoides como a quercetina e kaempferol também reforça o perfil antioxidante da planta (Klimek-Szczykutowicz et al., 2019; Zaman et al., 2024)

Além do uso popular, o agrião também vem sendo explorado na indústria de alimentos e farmacêutica, principalmente devido ao seu perfil funcional. Sua incorporação em produtos naturais e nutracêuticos está em expansão, sendo valorizado por alegações ao seu

potencial de promover melhorias a saúde cardiovascular, auxiliar no fortalecimento do sistema imune e atuar na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (Klimek-Szczykutowicz et al., 2019).

Em contrapartida, alguns estudos reportam que o agrião (*N. officinale*) pode estar associado à contaminação microbiológica, especialmente por patógenos de origem fecal, devido às condições de cultivo em ambientes aquáticos. O agrião é uma hortaliça amplamente consumida, sendo geralmente ingerida crua, sem qualquer tipo de cozimento ou tratamento térmico, o que agrava os riscos à saúde pública associados ao seu consumo (Googolee et al., 2020).

Estudos anteriores reforçam os riscos microbiológicos associados ao consumo de agrião cru. Um exemplo foi o surto ocorrido na Inglaterra, em 2013, onde 19 pessoas adoeceram, algumas necessitando de hospitalização, após a ingestão de agrião contaminado com a cepa virulenta *Escherichia coli* O157. A origem da contaminação foi atribuída às criações de gado nas proximidades e ao escoamento de água contaminada para os leitos de cultivo (Jenkins et al., 2015). Além disso, estudos conduzidos por Donnison, Ross e Dixon (2009) confirmam essas preocupações, ao identificarem *E. coli* e *Campylobacter* respectivamente em amostras de agrião, sendo que mais da metade das amostras coletadas na Nova Zelândia não atenderam aos critérios de segurança alimentar estabelecidos.

Figura 1 – Agrião (*N. officinale* R. Br.) em pleno estágio vegetativo



Fonte: USDA Plants Database.

2.3 Tecnologias Térmicas e Sanitizantes

Os tratamentos baseados na utilização do calor são considerados métodos de conservação convencional sendo os mais utilizados nas indústrias. O processamento térmico garante a segurança alimentar e melhora a vida útil, mas também pode afetar adversamente a qualidade dos alimentos. Esses métodos são eficientes no ponto de vista microbiológico, principalmente quando submetido ao processo de esterilização, porém causam danos na matriz alimentar afetando diretamente a composição nutricional, a qualidade sensorial, e em alguns casos, a estrutura da matriz (Miguel et al., 2023; Lopes, S. Sant'Ana e Freire, 2023).

Ainda que a inativação microbiológica possa ser alcançada com o uso de tecnologias térmicas, esses métodos ainda apresentam algumas limitações podendo resultar na degradação da qualidade dos alimentos. Além disso, quando os microrganismos são capazes de produzir toxinas ou biofilmes, é requerida condições mais severas de temperatura, tornando-se um problema para o produto, principalmente do ponto de vista nutricional e sensorial. Nesse sentido, métodos que não envolvem o calor representa uma abordagem promissora e vêm sendo explorado pela indústria de alimentos para manter a qualidade do produto enquanto são capazes de descontaminar os alimentos (Subrahmanyam et al., 2024).

Já os métodos químicos tradicionais, como a cloração, apresentam limitações significativas do ponto de vista microbiológico, toxicológico e tecnológico (Ramos et al., 2013). Embora o hipoclorito de sódio seja amplamente empregado devido ao baixo custo e à relativa facilidade de aplicação, sua eficácia pode ser reduzida na presença de matéria orgânica, nos quais microrganismos patogênicos podem persistir. Além disso, o uso de cloro está associado à formação de subprodutos da desinfecção, como trihalometanos e ácidos haloacéticos, compostos potencialmente tóxicos, o que levanta preocupações em termos de segurança química (Ramos et al., 2013). Do ponto de vista microbiológico, há relatos de microrganismos com maior tolerância aos desinfetantes clorados, especialmente quando associados a superfícies vegetais complexas comprometendo a eficácia do tratamento. Quanto a questão sensorial, o cloro pode conferir sabor e odor residuais indesejáveis, alterando o perfil sensorial original dos produtos frescos. Nesse cenário, torna-se pertinente a busca por tecnologias não térmicas, capazes de promover inativação microbiana com menor formação de subprodutos químicos e menor impacto sensorial (Mao et al., 2021; Pinela et al., 2016).

2.4 Tecnologias não térmicas

Estudos relacionados ao impacto de novos métodos de conservação e de processamento de alimentos utilizando tecnologias não térmicas na promoção da segurança alimentar, melhoria nas propriedades funcionais, nutricionais e sensoriais tem sido avaliados. Como não há uma única técnica que apresente alto potencial para todos os requisitos avaliados, a crescente busca por novas tecnologias para substituir os tratamentos térmicos e superar as limitações torna-se fundamental. As principais tecnologias aplicadas são ultrassom, plasma frio, luz pulsada, ozônio, alta pressão, dióxido de carbono supercrítico, ultravioleta (UV) e campo elétrico pulsado (Lopes, S. Sant’Ana e Freire, 2023).

No geral, as tecnologias emergentes promovem a manutenção da qualidade sensorial, melhoria na qualidade nutricional, estabilidade dos alimentos, contribuindo para otimizar os processos, diminuindo gastos energéticos e melhoria da sustentabilidade ambiental. Plasma frio, luz pulsada e ultrassom, são tecnologias promissoras, já reconhecidas pelo seu potencial de reduzir a carga microbiana, inativar atividade enzimática e contribuir para concentração de compostos bioativos. Com isso, a crescente demanda por alimentos de alta qualidade tem levado ao desenvolvimento de tecnologias de processamento não térmico. Logo, o aprimoramento do uso dessas tecnologias, bem como estudos aprofundados para sua aplicação buscando melhores resultados tornam-se necessários (Pohl et al., 2022; Cai et al., 2024).

2.4.1 Plasma Frio

2.4.1.1 Aspectos Gerais da Tecnologia Plasma Frio

A tecnologia de Plasma Frio (CP) é caracterizada como processamento não térmico que utiliza eletricidade e gases transportadores reativos e está sendo atualmente explorada na indústria alimentícia e é aplicada como uma alternativa para inativar enzimas, destruir microrganismos, preservar alimentos e manter a qualidade sem empregar agentes químicos antimicrobianos ou técnicas tradicionais de processamento térmico (pasteurização, esterilização) para manter os atributos de qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (Wang et al., 2022).

O plasma consiste em um gás que pode ser parcial ou totalmente ionizado. Uma variedade de gases tem sido empregada como gás de processo para geração de plasma, como o

hélio (He), argônio (Ar), nitrogênio (N) ou sua combinação com oxigênio, contendo em sua composição espécies reativas de oxigênio (ROS: O, O₂, O₃ e OH), espécies reativas de nitrogênio (RNS: NO, NO₂ e NO_x), radiação ultravioleta (UV), radicais livres, e partículas carregadas (Bezerra *et al.*, 2023; Saremnezhad *et al.*, 2021).

A ação antimicrobiana do plasma está relacionada principalmente à geração dessas espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são oxigênio atômico (O), ânion superóxido (O₂⁻), ozônio (O₃), oxigênio singlete (¹O₂) e radical ânion carbonato (CO₃⁻). Já as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são nitrogênio atômico (N), nitrogênio excitado (N₂), óxido nítrico (NO), radical dióxido de nitrogênio (NO₂), peroxinitrito (ONOO⁻) e ácido peroxinitroso (OONOH). Entre as moléculas carregadas, o radical hidroxila (OH), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e os elétrons servem como espécies reativas promissoras que podem descontaminar bactérias (Yang *et al.*, 2020). Esses agentes atacam alvos biológicos essenciais, promovendo peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas estruturais e enzimáticas, ruptura da parede celular, alteração do potencial transmembrana e dano ao DNA por quebras de fita e oxidação de bases nitrogenadas (Laroque *et al.*, 2022). Em paralelo, há a emissão de fótons UV e o impacto físico de íons e elétrons acelerados, que contribuem para a desestabilização da célula microbiana (Anuntagool *et al.*, 2023).

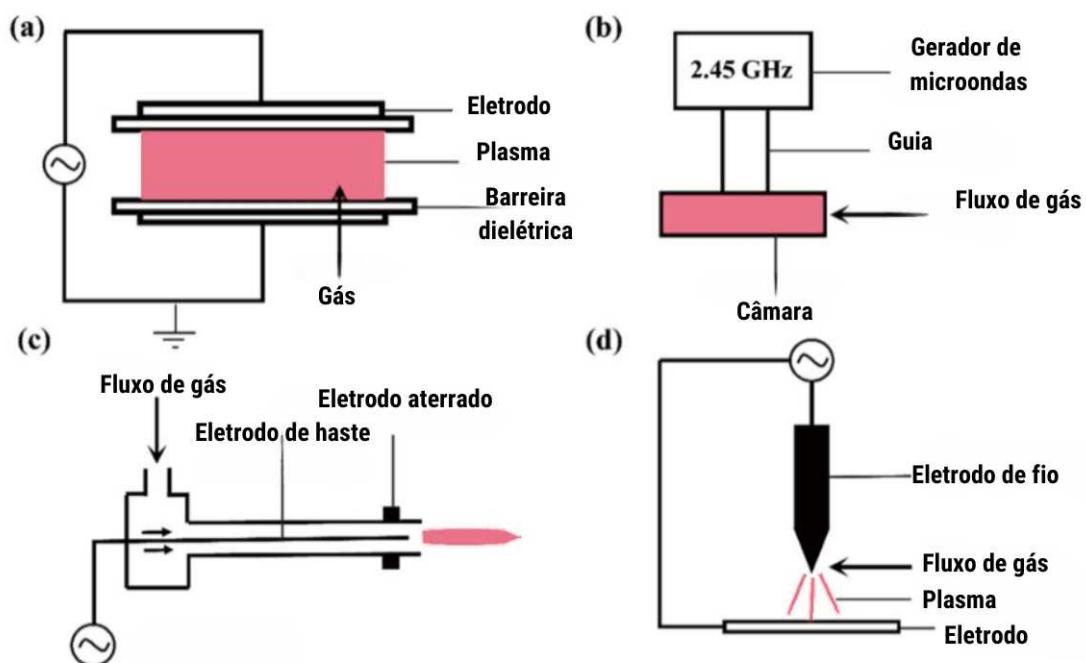
Além do efeito bactericida direto, o plasma frio também exerce efeito bacteriostático. Exposição a níveis subletais pode comprometer a integridade da membrana celular, reduzir a atividade metabólica e induzir alterações morfológicas, como encurtamento celular e transição da forma bastonete para esférica, já relatada em *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (Dezest *et al.*, 2017). Tais alterações favorecem a entrada dos microrganismos em estado VBNC, no qual permanecem metabolicamente ativos, porém não cultiváveis por métodos tradicionais, mantendo potencial risco à saúde pública. Além disso, estudos indicam que o plasma pode interromper os sinais de quorum sensing, reduzindo a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilmes, o que reforça seu potencial como tecnologia de controle microbiano eficaz e preventiva (Gan *et al.*, 2021).

O processamento utilizando plasma pode ser dividido em térmico e não térmico e difere devido o mecanismo de geração. O plasma térmico requer alta temperatura, o que gera alta energia com todas as espécies químicas constituintes em equilíbrio termodinâmico, sem transferência de energia entre si. Já o plasma não térmico, há um desequilíbrio termodinâmico entre as espécies, e sua geração ocorre sob pressão atmosférica ou de vácuo com temperatura variando abaixo de 60 °C e os elétrons transferem energia dentro de cada colisão sendo

requerido pouca eletricidade. Devido à baixa temperatura nas aplicações de plasma frio, torna-se mais adequado para aplicação em alimentos, assim como o custo energético é mais baixo se comparado com as tecnologias mais utilizadas atualmente (Liu et al., 2024; Subrahmanyam et al., 2024).

A maioria dos tipos de plasma relatados na literatura são subcategorias ou combinações de descargas de barreira dielétrica (DBD), plasma de descarga luminosa (glow plasma), descargas corona, jatos de plasma ou descargas de micro-ondas (fig. 2).

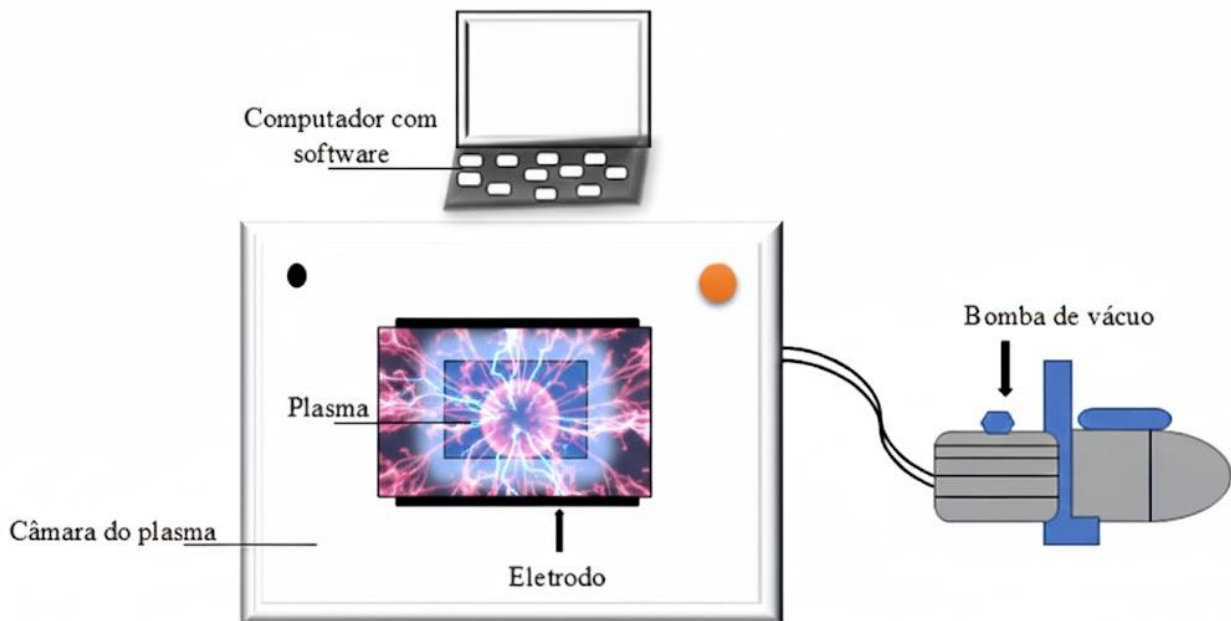
Figura 2 – Diferentes configurações de fontes de plasma: a) Descarga de barreira dielétrica (DBD) b) Descarga de micro-ondas c) Jato de plasma à pressão atmosférica d) Descarga corona



Fonte: Adaptado de Surowsky *et al.*, 2015; Lui *et al.*, 2024.

O plasma de descarga luminosa (*glow discharge*) é gerado em uma câmara sob vácuo, onde um gás é continuamente introduzido. A ionização ocorre pela aplicação de alta voltagem entre dois eletrodos, formando íons e elétrons que sustentam o plasma. Fontes de energia em alta frequência mantêm o processo, enquanto a bomba de vácuo garante o fluxo constante e a estabilidade do sistema. Em particular, apresenta vantagens como baixa temperatura operacional, estabilidade do campo elétrico e penetração uniforme (fig. 3) (Galaly e Dawood, 2024).

Figura 3 – Configuração do plasma de descarga luminosa (glow)



Fonte: elaborado pela autora.

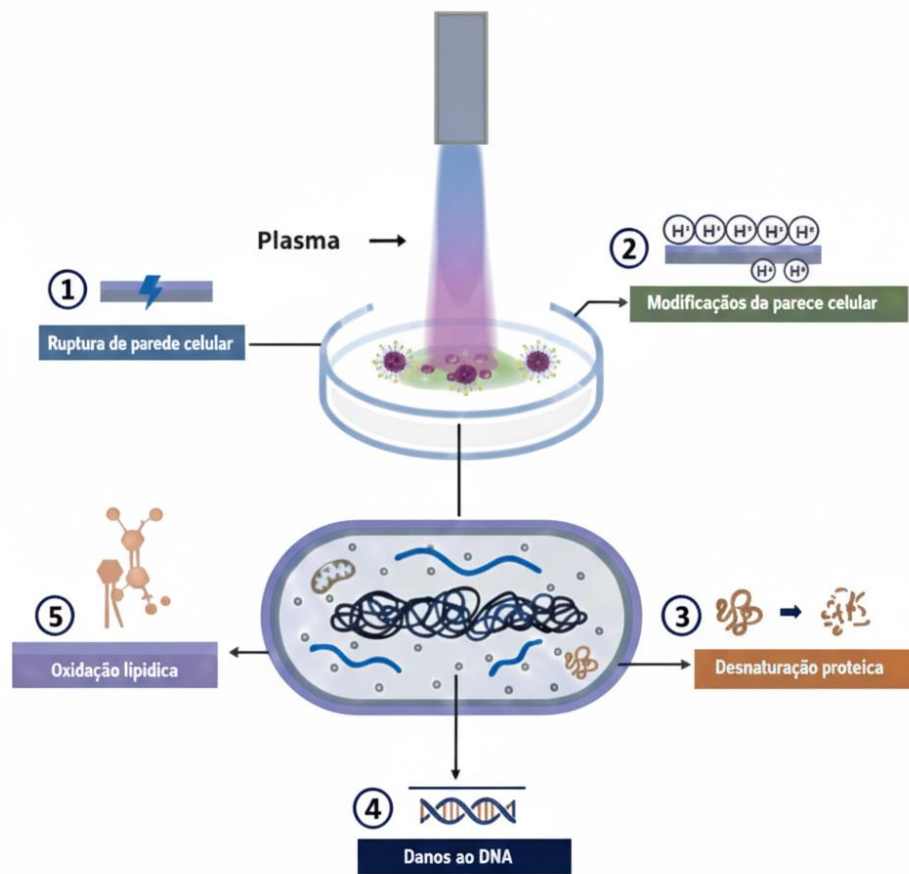
2.4.1.2 Aplicação em Alimentos

Estudos mais recentes têm demonstrado uma significativa ampliação na investigação referente à aplicação do plasma frio no processamento de alimentos. Pesquisas indicam a eficácia deste procedimento na inativação de microrganismos patogênicos de origem alimentar, Subrahmanyam et al. (2024) no acondicionamento de embalagens, Ziuzina et al. (2020), degradação de toxinas, Liu et al. (2024) e na inativação de enzimas degradativas.

A efetividade antimicrobiana promovida pelo CP é determinada por uma série de parâmetros, incluindo fatores ambientais como temperatura, umidade, características intrínsecas do alimento, umidade, pH, composição, volume, propriedades de superfícies e parâmetros de processamento do plasma como voltagem, frequência, gás de utilização, fluxo, tempo de tratamento, tipo de eletrodo utilizado, headspace e características do microrganismo. (Feizollahi, Misra e Roopesh, 2021).

As combinações gasosas produzidas durante a CP geram espécies reativas importantes que desempenham papel essencial para inativação por meio da agressão na parede celular do microrganismo que possui influência nos componentes intracelulares. Essas espécies reativas promovem estresse oxidativo e ruptura da membrana celular por meio de peroxidação lipídica, inativação de enzimas, desnaturação proteica, oxidação de aminoácidos e clivagem do ácido desoxirribonucleico (DNA) de acordo com a fig. 4 (Bourke et al., 2018; Gan et al., 2021).

Figura 4 – Mecanismo de ação do plasma frio na célula microbiana



Fonte: Adaptado de Subrahmanyam *et al.*, 2024.

Pesquisas realizadas por Albertos et al. (2019) utilizando como matéria-prima o peixe arenque do Atlântico observaram que a variação da voltagem produzida pelo plasma possui impacto significativo na redução microbiana, na oxidação lipídica, bem como na mudança de cor. Uma voltagem mais alta de tratamento com o plasma DBD (80 kV por 5 min) demonstrou uma maior eficácia na inibição de microrganismos. Utilizando uma voltagem menor (70 kV) resultou em uma menor perda de tonalidade vermelha e um aumento mínimo na tonalidade amarela, sugerindo que ocorreu uma menor oxidação lipídica.

Kim e Min (2018) ao realizarem estudos da correlação entre a vaporização de umidade e o sistema DBD observaram que a redução microbiana apresentou uma relação inversa com a frequência (15–35 kHz) e uma relação direta com o tempo de tratamento (2–20 minutos). A aplicação do sistema DBD em conjunto com a vaporização de umidade a 15 kHz de frequência por 20 minutos resultou na maior redução de *S. Enteritidis*, *E. coli O157* e *L.*

monocytogenes (3,1, 1,4 e 1,1 log UFC/cm², respectivamente) em flocos de cebola, sem alteração na morfologia, cor e umidade.

A inativação de *E. coli* e *L. innocua* em morangos e folhas de espinafre utilizando o tratamento DBD em modo estático e contínuo foi investigada por Ziuzina et al. (2020). Os autores observaram que o tratamento estático demonstrou alcançar efeitos antimicrobianos superiores em comparação com o tratamento contínuo para *E. coli* e *L. innocua* ambos inoculadas em espinafre e *E. coli* em morangos, com reduções de (2,20, 1,70 e 2,00 log UFC/mL), respectivamente. No entanto, para *L. innocua* inoculada em morangos, o tratamento contínuo mostrou-se mais eficaz, com uma redução de 3,80 log UFC/mL. Este efeito antimicrobiano está intimamente relacionado com interação das espécies reativas formadas com a matriz durante o processamento com o plasma.

Outro estudo conduzido por Prasad et al. (2017) que avaliaram a qualidade de tomates inoculados com *E. coli*, investigou a estabilidade microbiana durante o armazenamento após a aplicação de descarga de barreira dielétrica (DBD) atmosférica a 15 e 60 kV, por 5, 10, 15 e 30 minutos. O tratamento com DBD a 60 kV por 15 minutos promoveu a maior redução de *E. coli*, alcançando aproximadamente 6 log UFC/mL após 48 horas de armazenamento a 4 °C.

Estudos utilizando plasma de descarga luminosa são mais escassos, porém, Yang et al. (2020) realizaram um estudo com plasma de descarga luminescente com foco na degradação de *Escherichia coli* resistente a antibióticos contendo genes de resistência (*tetA*, *tetR*, *aphA*) e o gene de transposase (*tnpA*) em solução salina estéril. Os autores demonstraram que o plasma foi capaz de inativar efetivamente a *E. coli* resistente, promovendo a remoção dos genes de resistência antimicrobiana reduzindo o risco de sua transferência horizontal. Após 15 minutos de tratamento, observou-se uma redução de aproximadamente 4,7 log, medida por quantificação de rRNA 16S, evidenciando o forte potencial do plasma por descarga luminosa para inativação microbiana e degradação genética.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do plasma frio luminoso na redução da carga microbiana de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium e *Escherichia coli* inoculadas em folhas de agrião fresco.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos parâmetros de fluxo de gás e tempo de processamento do plasma frio para inativação de *S. Typhimurium* e *E.coli* inoculadas em folhas de agrião;
- Avaliar o efeito dos parâmetros de fluxo de gás e tempo de processamento da tecnologia não térmica para inativação de *S. Typhimurium* e *E.coli* em suspensão;
- Avaliar a viabilidade celular pelo método MTT e verificar a possível presença de células em estado viável, mas não cultivável (VBNC);
- Verificar através da microscopia eletrônica de varredura a possível alteração na célula dos microrganismos após os processamentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparo do estoque das cepas microbianas

Os microrganismos foram obtidos do banco da Coleção Americana de Cultura de Tipo. As culturas estoque de cada microrganismo *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E.coli* ATCC 25922 foram armazenadas sob temperatura de congelamento em criotubos de 2,0 mL, conservadas em solução de glicerol.

4.1.1 Preparação do inóculo de *S. Typhimurium*

A cepa bacteriana de *Salmonella* Typhimurium foi cultivada em meio seletivo Samonella-Shigella (SS) (HiMedia, Índia) para confirmação da pureza das colônias, com auxílio da coloração de Gram e observação em microscópio óptico. Para a ativação do microrganismo, 1% da cultura estoque foi inoculado em caldo BHI (HiMedia, Índia) e incubado a 37 °C por 18 h sob agitação a 125 rpm para posterior padronização da cepa a partir das medições de densidade óptica e contagem em placas.

4.1.2 Preparação do inóculo de *E.coli*

Culturas de *E.coli* foram semeadas em ágar MacConkey para isolamento e posterior confirmação das colônias típicas através da coloração de Gram e visualização em microscópio. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida, após a confirmação, realizou-se o processo de ativação em meio de cultura não seletivo BHI (HiMedia, Índia) a partir da adição de 1% da cultura, seguida da incubação em sua temperatura ótima de crescimento (37 °C) sob agitação de 125 rpm por 24 h. Medições de densidade óptica e contagem de placas foram utilizadas para a padronização da cepa de acordo com a quantidade de log UFC/ml inicial desejada.

4.1.3 Obtenção das suspensões microbianas padronizadas

Para obtenção da suspensão padronizada com 7-8 log UFC/mL, os microrganismos em fase exponencial de crescimento foram centrifugados a 4500 ×g durante 15 min a 4 °C em

água peptonada a 0,1% (Alves *et al.*, 2024; Tahi *et al.*, 2021) Após a centrifugação foram realizadas leituras de absorbância a partir da densidade óptica em um comprimento de onda de 620 nm, utilizando um espectrofotômetro. Cada suspensão bacteriana preparada para leitura em espectrofotômetro foi submetida a diluições seriadas para contagem em placas utilizando a técnica da gota para *S. Typhimurium* e *E.coli* objetivando a obtenção de uma suspensão ajustada para ~7-8 log UFC/mL de cada microrganismo respectivamente. Medições de densidade óptica e contagem em placas foram utilizadas para o preparo das suspensões padronizadas com concentração inicial do log de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) que posteriormente foram inoculadas em agrião e submetidas aos tratamentos não térmicos por plasma frio.

4.2 Preparo do agrião (*N. officinale*) e inoculação das cepas

O agrião (*N. officinale*), adquirido em mercado local na cidade de Fortaleza-CE sem danos mecânicos visíveis foi selecionado e submetido a processo de higienização com solução de hipoclorito de sódio (NaClO, 100 ppm por 15 min) (Mcglynn, 2016). Em seguida, as folhas foram lavadas com água destilada estéril para remoção de resíduos do sanitizante. Após a higienização, o material vegetal foi transferido para o interior de uma cabine de fluxo laminar previamente esterilizada, onde permaneceu para secagem sob condições assépticas por 30 min (Pontes *et al.*, 2026). Posteriormente, alíquotas de aproximadamente 1 g de folhas de agrião foram pesadas e acondicionadas em placas de Petri estéreis para posterior inoculação dos microrganismos (fig. 5).

Figura 5 – Folhas de agrião acondicionadas em placas de Petri para processamento



Fonte: elaborado pela autora.

Após a pesagem das amostras de agrião, procedeu-se à etapa de inoculação, a qual foi realizada após a padronização das cepas microbianas utilizadas, por meio da adição de 100 µL de suspensão microbiana com concentração ajustada para 7 - 8 log UFC/mL. Em seguida, as placas contendo as amostras inoculadas foram mantidas sob fluxo laminar estéril para secagem, visando a posterior aplicação dos tratamentos de descontaminação por plasma frio de descarga luminosa. Placas controle, não submetidas a nenhum tipo de tratamento, também foram preparadas para fins comparativos. A estabilidade microbiológica do agrião foi avaliada após 24, 72 e 120 h de armazenamento sob temperatura de 4 °C, para cada condição experimental testada.

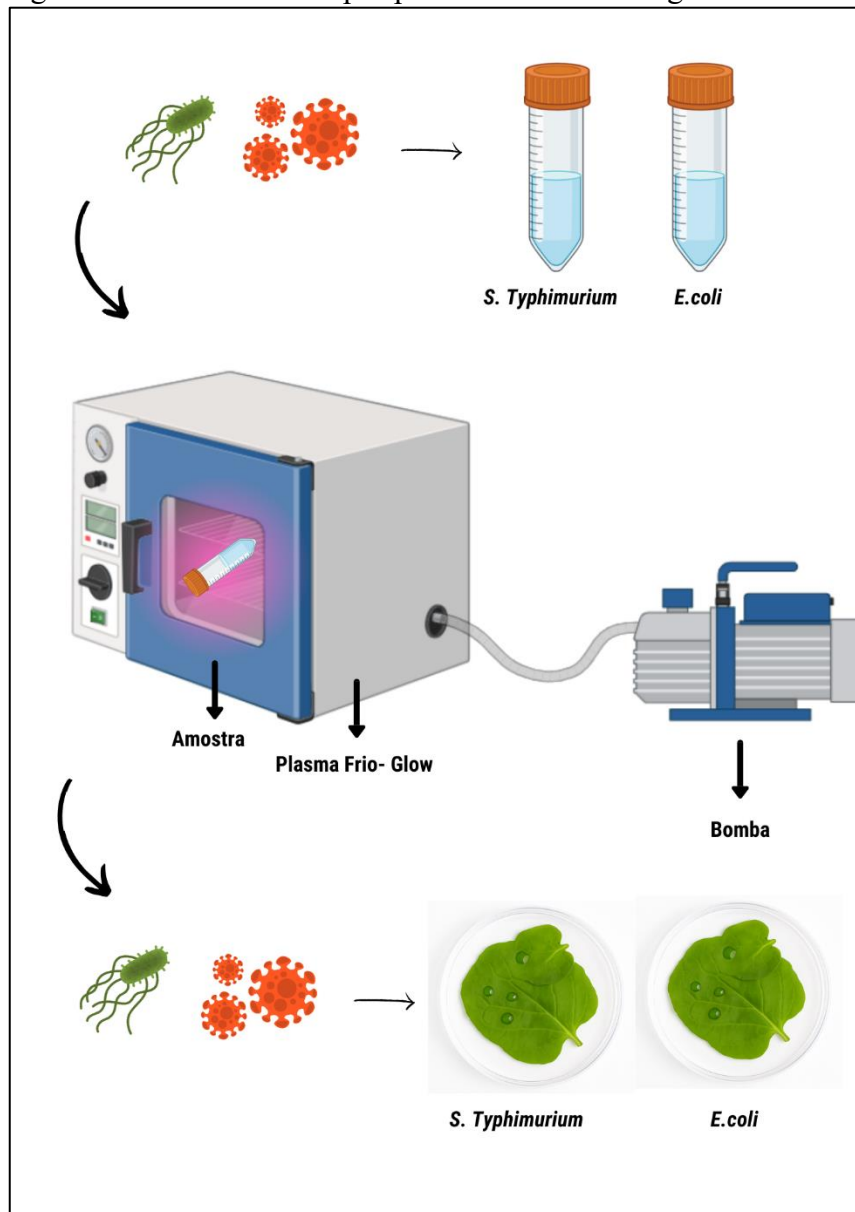
4.3 Processamentos não térmicos

Os processamentos e análises foram realizados no Laboratório de Biotecnologia no Departamento de Engenharia de Alimentos (DEAL) e Laboratório de Análises e Desenvolvimento de Processos no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal do Ceará.

4.3.1 Aplicação do plasma frio de descarga luminosa para inativação de *S. Typhimurium* e *E.coli* inoculadas em agrião

O tratamento com plasma frio foi realizado utilizando um sistema de plasma de descarga de gás PE-50 (Plasma Etch, EUA), operando com ar sintético (grau FID 4.0, pureza de 99,95%, White Martins, Brasil), a uma radiofrequência de 50 kHz e uma diferença de potencial elétrico de 80 kV. Folhas de agrião foram colocadas em placas de Petri e introduzidas na câmara de vácuo do sistema de plasma frio de descarga luminosa (19 x 22 x 9 cm), mantida a uma pressão de aproximadamente 0,3–0,4 bar à temperatura ambiente de 25 °C, utilizando ar sintético como gás de excitação (fig. 6) (Morais, de et al., 2024).

Figura 6 – Processamento por plasma frio de descarga luminosa



Fonte: elaborado pela autora.

As amostras foram submetidas a diferentes condições experimentais, variando o fluxo de gás (10, 20 e 30 ml/min) e o tempo de exposição (10, 15 e 20 min). O tempo de armazenamento das folhas de agrião, tanto tratadas quanto do grupo controle, também foi avaliado em 24, 72 e 120 h após o tratamento com plasma para cada condição experimental, com todas as amostras armazenadas a 4 °C durante o período de avaliação. Essas condições foram selecionadas com base em estudos preliminares e nos limites de processamento do equipamento. As condições de tempo e temperatura foram selecionadas considerando o armazenamento comercial utilizado para o agrião (Tabela 1).

4.3.2 Aplicação do plasma frio de descarga luminosa para inativação das suspensões de *S. Typhimurium* e *E.coli*

Para os ensaios conduzidos com o plasma frio de descarga luminosa apenas com as suspensões microbianas, as mesmas foram submetidas ao tratamento conforme os parâmetros estabelecidos no estudo (Tabela 1). Os processamentos foram conduzidos em um gerador de plasma frio de descarga luminosa como descrito na seção 4.3.1.

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas no estudo

Código do tratamento	Fluxo de gás (ml/min)	Tempo de exposição (min)	Microrganismos	Tempo de armazenamento
F10T10	10	10	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F10T15	10	15	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F10T20	10	20	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F20T10	20	10	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F20T15	20	15	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F20T20	20	20	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F30T10	30	10	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F30T15	30	15	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
F30T20	30	20	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h
Controle	—	—	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	24, 72, 120 h

Fonte: elaborado pela autora.

4.4 Análises Microbiológicas

4.4.1 Enumeração de bactérias

Diluições em série foram realizadas em água peptonada com a suspensão microbiana e com as folhas de agrião previamente contaminadas, considerando as amostras de antes e depois dos tratamentos não térmicos para avaliar a carga microbiana de *S. Typhimurium* e *E.coli*. A presença de colônias típicas foram avaliadas através da técnica de plaqueamento com método da gota em meio de cultura seletivo considerando cada microrganismo. As placas

foram incubadas a 37 °C para *S. Typhimurium* e *E. coli* por 24 h (Herigstad; Hamilton; Heersink, 2001; Tavares *et al.*, 2025). Para cada experimento, todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata. O número de colônias para cada patógeno foi calculado e expresso como o log de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL e/ou g) de suspensão bacteriana estimadas usando o método de contagem de colônias culturais em placa com limite de detecção de 1,5 UFC/g e/ou mL. A eficácia dos tratamentos não térmicos foi avaliada por meio da redução da carga microbiana, conforme expressa na Equação 1:

$$\text{Log } f = \text{log } (N_0) - \text{log } (N) \quad (1)$$

Onde N_0 representa a população inicial de microrganismos antes do tratamento (UFC/mL e/ou g) e N é a carga microbiana após os tratamentos (UFC/mL e/ou g)

4.4.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT

A viabilidade celular das culturas bacterianas de *Escherichia coli* e *S. Typhimurium* foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico com MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo]. Este método baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas de reduzir o sal de tetrazólio (amarelo) a cristais insolúveis de formazan (cor roxa), os quais são posteriormente solubilizados e quantificados por leitura espectrofotométrica.

Para realização do ensaio foram utilizadas culturas frescas de *E. coli* e *Salmonella*, placas de 96 poços estéreis, solução de MTT (5 mg/mL em PBS estéril), solução de solubilização isopropanol, tampão fosfato salino (PBS), meio BHI, micropipetas e ponteiros estéreis, incubadora a 37 °C e espectrofotômetro de microplacas.

Inicialmente, culturas bacterianas frescas foram obtidas a partir da inoculação das cepas em caldo BHI, seguido de incubação a 37 °C por 16–18 h. Após centrifugação e respectivas lavagens com PBS, as suspensões bacterianas foram ajustadas para uma densidade celular padronizada correspondendo aproximadamente a 7-8 log UFC/mL. Suspensões bacterianas foram submetidas aos processamentos por plasma frio e seguida homogeneizadas por vortex e utilizadas diretamente no ensaio. Poços contendo apenas meio de cultura serviram como controle (branco). Ainda foram preparados controles positivos com células inativadas através do método de esterilização com autoclave.

Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos em cada poço de uma placa de 96 poços estéril. Posteriormente, adicionaram-se 10 µL da solução de MTT

(5 mg/mL) em cada poço, evitando a formação de bolhas e protegendo a placa da luz direta. As placas foram novamente incubadas a 37 °C por um período de 2 h, durante o qual as células viáveis reduziram o MTT, formando cristais insolúveis de formazan no interior das células.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas com posterior descarte do sobrenadante e adicionou-se 100 µL isopropanol como solução de solubilização para dissolver os cristais de formazan. A placa foi suavemente agitada por 10 a 15 minutos até a completa homogeneização da coloração púrpura. A absorbância foi medida em 570 nm em espectrofotômetro de microplacas, utilizando 630 nm como comprimento de onda de referência para correção do fundo. Todas as amostras processadas foram avaliadas em 0, 24 e 72h após o processamento (Oh e Hong, 2022; Xu et al., 2023).

4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As suspensões microbianas foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), visando observar as possíveis alterações morfológicas após os tratamentos não térmicos, conforme protocolo adaptado de Fonteles et al. (2024) e Tahi et al. (2021). As células bacterianas foram coletadas por centrifugação e lavadas sequencialmente com tampão cacodilato. Em seguida, realizou-se a fixação adicionando glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato ao pellet, mantendo-se em contato por, no mínimo, 1 h. Após a fixação, o glutaraldeído foi removido e o pellet lavado com água deionizada. A desidratação foi conduzida com etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). As amostras foram secas à temperatura ambiente (25 °C), fixadas em suportes de observação com fita condutora de carbono e recobertas com ouro/paládio. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura para avaliação das estruturas superficiais (Miguel et al., 2023).

4.5 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar o efeito das condições de tratamento com plasma frio (vazão de gás, tempo de exposição e período de armazenamento) na contagem microbiana e na viabilidade celular. Quando diferenças estatisticamente significativas foram detectadas ($p < 0,05$), o teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado para comparar as médias entre os tratamentos.

O intervalo de confiança de 95% foi adotado para todas as análises. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica, versão 10 (StatSoft, EUA).

4.6 Modelagem cinética

Para descrever a cinética de sobrevivência não linear, foram empregados dois modelos complementares. O modelo de Weibull foi utilizado para avaliar a distribuição da resistência na população microbiana, enquanto o modelo de Peleg-Corradini foi selecionado por sua capacidade de quantificar a recuperação microbiana (recrescimento) durante o armazenamento de acordo com Bermúdez-Aguirre e Corradini, (2012), um fenômeno frequentemente negligenciado por modelos baseados puramente na inativação. A capacidade preditiva e a qualidade do ajuste dos modelos foram avaliadas utilizando o coeficiente de determinação (R^2) como critério principal. Todos os parâmetros foram estimados por meio de regressão não linear, utilizando um script personalizado em Python com a biblioteca `scipy.optimize.curve_fit`. O pré-processamento dos dados incluiu a inserção da coordenada (0,0) para representar o estado imediatamente após o tratamento, e um limite de detecção de 1,5 UFC/g foi adotado para os cálculos.

4.6.1 Modelo Weibull

O modelo de Weibull foi utilizado para avaliar a distribuição da resistência na população microbiana. Ele é particularmente eficaz para descrever a inativação irreversível, onde a população exibe sensibilidade ao estresse oxidativo acumulado.

$$\log_{10} \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (2)$$

Onde:

δ (Tempo Característico): Representa o tempo necessário para a primeira redução decimal na população.

p (Parâmetro de Forma): Indica a curvatura do gráfico de sobrevivência (côncavo para cima se $p < 1$, côncavo para baixo se $p > 1$), refletindo a cinética de acúmulo de danos.

4.6.2 Modelo Peleg-Corradini

O modelo de Peleg-Corradini foi selecionado por sua capacidade de quantificar a potencial recuperação microbiana (recrescimento) durante o armazenamento, um fenômeno

frequentemente negligenciado por modelos baseados puramente na inativação. Este modelo leva em consideração o destino metabólico de células subletalmente lesionadas.

$$\log_{10} \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \left(\frac{a \cdot t}{1 + b \cdot t} \right) + (c \cdot t) \quad (3)$$

a (Taxa Inicial): A inclinação da curva no tempo zero, representando o impacto imediato do tratamento na população.

b (Resistência): Uma constante cinética que mede a rapidez com que a taxa de inativação diminui à medida que a população atinge uma assíntota.

c (Taxa de Recuperação): Um parâmetro que representa o crescimento pós-processamento. Um valor de $c > 0$ indica a ressuscitação ou recrescimento de células danificadas, enquanto $c < 0$ indica inativação contínua durante o armazenamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Redução microbiana de *E.coli*

Os tratamentos com plasma frio de descarga luminosa resultaram em reduções logarítmicas significativas de *E. coli* em folhas de agrião em comparação com o controle não tratado, que não apresentou redução durante o armazenamento (Tabela 2). Após 24 h, as reduções variaram de $2,44 \pm 0,07$ log (F10T10) a valores abaixo do limite de detecção (F10T20) (inativação completa). Exposições de alto fluxo/mais longas também produziram reduções acentuadas, como $4,93 \pm 0,00$ log (F30T15) e $4,83 \pm 0,17$ log (F30T20).

Tabela 2 – Redução logarítmica de *E. coli* com e sem agrião após tratamento com plasma de descarga luminosa durante 24, 72 e 120 h de armazenamento, variando o fluxo de gás (10, 20 e 30 mL/min) e o tempo de exposição (10, 15 e 20 min)

Tratamentos	24h (log UFC/g)	24h (log UFC/mL)	72h (log UFC/g)	72h (log UFC/mL)	120h (log UFC/g)	120h (log UFC/mL)
	Com agrião	Sem agrião	Com agrião	Sem agrião	Com agrião	Sem agrião
F10T10	$2,44 \pm 0,07^{cAB}$	< LD ^{aA}	$2,00 \pm 0,04^{fB}$	< LD ^{aA}	$2,67 \pm 0,07^{cdA}$	< LD ^{aA}
F10T15	$3,37 \pm 0,06^{dB}$	< LD ^{aA}	$2,65 \pm 0,13^{cC}$	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}
F10T20	$7,00 \pm 0,00^{aA}$	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}
F20T10	$4,00 \pm 0,00^{cA}$	< LD ^{aA}	$3,90 \pm 0,17^{cA}$	< LD ^{aA}	$2,61 \pm 0,01^{cdB}$	< LD ^{aA}
F20T15	$3,68 \pm 0,28^{cdA}$	< LD ^{aA}	$3,41 \pm 0,11^{dA}$	< LD ^{aA}	$2,44 \pm 0,24^{dB}$	< LD ^{aA}
F20T20	$3,61 \pm 0,36^{cdB}$	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}
F30T10	$4,61 \pm 0,28^{bA}$	< LD ^{aA}	$4,34 \pm 0,11^{bB}$	< LD ^{aA}	$2,74 \pm 0,04^{cC}$	< LD ^{aA}
F30T15	$4,93 \pm 0,00^{bA}$	< LD ^{aA}	$4,44 \pm 0,20^{bB}$	< LD ^{aA}	$3,28 \pm 0,16^{bC}$	< LD ^{aA}
F30T20	$4,83 \pm 0,17^{bB}$	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}
Controle	$0,00 \pm 0,04^{fA}$	$0,03 \pm 0,04^{bB}$	$-0,23 \pm 0,07^{gB}$	$0,20 \pm 0,02^{bA}$	$-0,37 \pm 0,03^{eB}$	$0,23 \pm 0,04^{bA}$

Os valores representam a média da redução logarítmica $\log(N_0) - \log(N)$ de UFC/g \pm desvio padrão de *E. coli*. A inativação completa (< LD- Limite de Detecção) indica que nenhuma colônia viável foi detectada nas condições testadas.

Letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento das amostras.

Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: elaborado pela autora.

Após 72 h, um efeito letal tardio foi observado sob condições específicas. Os tratamentos (F20T20) e (F30T20) atingiram redução abaixo do limite de detecção (inativação

completa), semelhante a (F10T20). Em contraste, exposições mais curtas em qualquer taxa de fluxo resultaram em reduções menores em 72 h (F10T10) de 2,44 para 2,00 log; (F30T10) de 4,61 para 4,34 log, sugerindo recuperação parcial de células subletalmente lesionadas durante o armazenamento a 4 °C.

Em 120 h, valores abaixo do limite de detecção foi mantido para (F10T20), (F20T20), (F30T20) e também foi observada para (F10T15), indicando letalidade cumulativa de lesões induzidas por plasma ao longo do tempo. Por outro lado, tempos de exposição mais curtos em fluxo médio/alto (F20T10, F20T15, F30T10, F30T15) mostraram reduções finais menores (2,44–3,28 logs), consistentes com dano inicial insuficiente e reparo celular subsequente.

De modo geral, a inativação de *E. coli* dependeu fortemente do tempo de exposição e do fluxo de gás. Tratamentos de vinte minutos levaram consistentemente à eliminação completa imediata ou tardia, enquanto exposições mais curtas permitiram o crescimento parcial durante o armazenamento. Letras sobrescritas diferentes na Tabela 2 indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Além disso, a eficácia do tratamento foi modulada pela estrutura da matriz alimentar. Superfícies rugosas e irregulares, como as de hortaliças folhosas, fornecem barreiras físicas à penetração de espécies reativas, promovendo a sobrevivência microbiana em microambientes protegidos (Triantaphyllidou; Aggelopoulos, 2025). Esse fator pode explicar as diferenças na inativação observadas entre as suspensões microbianas, onde reduções de aproximadamente 7–8 log foram alcançadas em todos os tratamentos e períodos de armazenamento, e as folhas de agrião tratadas, que apresentaram reduções microbianas variáveis sob condições idênticas (Tabela 2).

As reduções mais acentuadas observadas em suspensões microbianas podem ser atribuídas à ausência de barreiras físicas e químicas, o que permite a interação direta entre as espécies reativas geradas pelo plasma e as células bacterianas. Além disso, há maior formação de espécies reativas quando em contato com a água. Nesses sistemas, a difusão de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ocorre de forma homogênea, maximizando o contato célula-plasma e promovendo danos cumulativos ao DNA, membranas e proteínas. Esse fenômeno tem sido relatado consistentemente em ensaios conduzidos exclusivamente com microrganismos em suspensão, onde reduções superiores a 6-7 log de *E. coli* e outros patógenos foram alcançadas independentemente da cepa ou do meio de cultura (Ziuzina *et al.*, 2015). Em contraste, quando o tratamento com plasma é aplicado a matrizes alimentares, tanto as propriedades estruturais quanto as químicas da superfície modulam sua eficácia, resultando em

uma inativação microbiana comparativamente menor (Tabela 2). A morfologia da superfície demonstrou influenciar significativamente a eficácia do plasma, por exemplo, Perinban et al. (2022) relataram maiores reduções de *E. coli* em folhas de espinafre liso (5,3 log UFC/g) em comparação com folhas de couve crespa (3,8 log UFC/g) tratadas em condições idênticas. Esses resultados destacam que as variações nas características da superfície entre hortaliças folhosas podem ser parcialmente responsáveis pelos diferentes padrões de inativação observados neste estudo (Singh e Thakur, 2024).

Embora o plasma frio apresente forte eficácia antimicrobiana na ausência de uma matriz alimentar, a inativação microbiana em superfícies de produtos deve ser interpretada de forma diferente, pois não implica em esterilização absoluta. Em segurança alimentar, as agências reguladoras definem a eficácia da sanitização em termos de reduções logarítmicas específicas, em vez de eliminação microbiana completa. Por exemplo, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) exige que os sanitizantes aplicados às superfícies alcancem uma redução de pelo menos 3 log em 5 minutos (Bland *et al.*, 2022).

Em condições práticas, as matrizes alimentares geralmente apresentam cargas microbianas menores do que os modelos experimentais de contaminação, com níveis entre 10^2 e 10^5 UFC/g, dependendo das características e do manuseio do produto. Portanto, a otimização de parâmetros do plasma, como duração do tratamento e fluxo de gás, é essencial para garantir que as reduções microbianas alcançadas em matrizes alimentares atendam às expectativas regulatórias, apesar das barreiras protetoras naturais que limitam as interações diretas entre o plasma e as células (Yang; Keener; Cheng, 2025).

Esses resultados podem ser explicados mecanicamente pela suscetibilidade da *E. coli* ao estresse oxidativo. Essa espécie é vulnerável a espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2), que são gerados durante a exposição ao plasma (Dharini, Jaspin e Mahendran, 2023; Nicol et al., 2020). Essas moléculas induzem peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA, comprometendo a integridade da membrana e a viabilidade celular (Yost e Joshi, 2015). Além disso, a estrutura relativamente mais simples da camada de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, em comparação com outras enterobactérias, facilita a penetração de ROS e acelera a perda da integridade celular (Paracini et al., 2022).

5.2 Redução microbiana de *S. Typhimurium*

O crescimento de *S. Typhimurium* foi monitorado por 120 h sob armazenamento a 4 °C para avaliar o efeito residual de espécies reativas geradas pelo plasma frio e o potencial dano permanente às células bacterianas. Os resultados são apresentados na Tabela 3, onde todos os tratamentos com plasma frio reduziram significativamente a carga microbiana em comparação com o controle que não apresentou redução.

Tabela 3 – Redução logarítmica de *S. Typhimurium* com e sem agrião após tratamento com plasma de descarga luminosa durante 24, 72 e 120 h de armazenamento, variando o fluxo de gás (10, 20 e 30 mL/min) e o tempo de exposição (10, 15 e 20 min).

Tratamentos	24h (log UFC/g)	24h (log UFC/mL)	72h (log UFC/g)	72h (log UFC/mL)	120h (log UFC/g)	120h (log UFC/mL)
	Com agrião	Sem agrião	Com agrião	Sem agrião	Com agrião	Sem agrião
F10T10	3,26±0,00 ^{cC}	< LD ^{aA}	4,17±0,00 ^{bB}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}
F10T15	3,50±0,06 ^{cC}	< LD ^{aA}	3,87±0,00 ^{cdB}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}
F10T20	3,81±0,10 ^{bA}	< LD ^{aA}	3,97±0,17 ^{cA}	< LD ^{aA}	3,60±0,07 ^{dB}	< LD ^{aA}
F20T10	3,87±0,00 ^{bB}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}	< LD ^{aA}
F20T15	4,07±0,17 ^{abA}	< LD ^{aA}	3,16±0,06 ^{fB}	< LD ^{aA}	3,97±0,17 ^{cA}	< LD ^{aA}
F20T20	3,31±0,09 ^{cC}	< LD ^{aA}	3,50±0,06 ^{eB}	< LD ^{aA}	4,17±0,00 ^{bA}	< LD ^{aA}
F30T10	3,97±0,17 ^{abA}	< LD ^{aA}	3,69±0,00 ^{dB}	< LD ^{aA}	3,30±0,03 ^{cC}	< LD ^{aA}
F30T15	3,81±0,10 ^{bA}	< LD ^{aA}	2,56±0,00 ^{gB}	< LD ^{aA}	2,13±0,04 ^{gC}	< LD ^{aA}
F30T20	4,17±0,00 ^{aA}	< LD ^{aA}	2,39±0,07 ^{gC}	< LD ^{aA}	2,98±0,02 ^{fB}	< LD ^{aA}
Controle	0,00±0,01 ^{dA}	0,03±0,02 ^{bC}	0,08±0,02 ^{hA}	0,38±0,04 ^{bB}	-0,70±0,03 ^{hB}	1,47±0,03 ^{bA}

Os valores representam a média da redução logarítmica $\log(N_0) - \log(N)$ de UFC/g \pm desvio padrão de *S. Typhimurium*. A inativação completa (< LD- Limite de Detecção) indica que nenhuma colônia viável foi detectada nas condições testadas.

Letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento das amostras.

Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: elaborado pela autora.

Após 24 h, os tratamentos F30T20 ($4,17 \pm 0,00$) e F20T15 ($4,07 \pm 0,17$) apresentaram as maiores reduções de *S. Typhimurium*, enquanto F10T10 ($3,26 \pm 0,00$) e F10T15 ($3,50 \pm 0,06$) exibiram reduções significativamente menores ($p < 0,05$). Após 72 h, o tratamento F20T10 manteve a maior redução (abaixo do limite de detecção), seguido por F10T10 ($4,17 \pm 0,00$) e F10T20 ($3,97 \pm 0,17$). Os tratamentos F30T15 ($2,56 \pm 0,00$) e F30T20

($2,39 \pm 0,07$) apresentaram as menores reduções nesse ponto, indicando diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Ao final de 120 h, F10T10, F10T15 atingiram as maiores reduções com contagens abaixo do limite de detecção, enquanto F20T10 permaneceu com a mesma redução de 72 h e F30T15 ($2,13 \pm 0,04$) e F30T20 ($2,98 \pm 0,02$) apresentaram reduções menores (Tabela 3), destacando que a eficácia do plasma frio depende tanto da vazão do gás quanto do tempo de tratamento, bem como do período de armazenamento.

De modo geral, os dados demonstram que vazões mais altas e tempos de exposição mais longos não resultam necessariamente em maiores reduções durante o armazenamento, enfatizando a importância de otimizar os parâmetros de tratamento para maximizar a inativação de *S. Typhimurium* em agrião.

Os resultados mostrados na Tabela 3, usando a matriz fresca, indicam que fluxos de gás mais baixos (10 mL/min) foram mais eficazes na inativação de *Salmonella*, alcançando reduções significativas em 10 e 15 minutos, sem benefício adicional de uma exposição mais longa (Lee; Jeon; Min, 2021).

Em geral, estudos com plasma frio mostraram que tempos de residência de gás prolongados e altas taxas de fluxo aumentam a geração e a liberação de espécies reativas nas superfícies dos alimentos, melhorando assim a eficiência da inativação microbiana. No entanto, Fan, Vinyard e Song (2022) relataram que, quando o peróxido de hidrogênio ativado por plasma frio foi usado como agente oxidante, as populações de *Salmonella enterica* na região da cicatriz do caule de plantas de tomate foram reduzidas, embora o aumento da duração da exposição não tenha produzido diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento.

Outro estudo relatado por Sudarsan e Keener (2022) não observaram efeito significativo ($p < 0,05$) na redução microbiana de *Salmonella enterica* com o aumento do tempo de exposição ao plasma, enquanto uma diminuição significativa foi observada com o armazenamento prolongado após o tratamento, confirmando a atividade antimicrobiana residual do plasma frio.

Por outro lado, estudos focados na dinâmica física do fluxo de plasma sugeriram que taxas reduzidas de renovação de gás podem aumentar a eficiência do tratamento, aumentando o tempo de residência de espécies reativas dentro da zona de descarga. Nessas condições, ocorre excitação e formação mais eficientes de radicais de alta energia, como O_3 , OH e NO, especialmente em plasma de descarga luminescente (Fernandes; Rodrigues, 2021; Misra; Schlüter; Cullen, 2016; Ziuzina *et al.*, 2015). Além disso, alguns estudos indicam que níveis de turbulência mais baixos podem contribuir para uma melhor estabilidade do campo

elétrico, prolongando a interação dessas espécies com as superfícies microbianas (Pontes *et al.*, 2026).

A inativação gradual observada ao longo do tempo é consistente com o dano subletal cumulativo, caracterizado por lesões irreversíveis que levam à morte celular tardia (Lv; Cheng, 2022). Uma tendência semelhante foi relatada por Sudarsan e Keener (2022), que observaram que a redução gradual nas populações de *Salmonella enterica* em folhas de espinafre tratadas com plasma frio atmosférico de alta voltagem (HVACP) durante 14 dias de armazenamento que foi atribuída a lesões subletais nos patógenos, prejudicando sua capacidade de reparo e crescimento.

Em consonância com os resultados obtidos, a redução progressiva na atividade metabólica observada no presente estudo sob algumas condições específicas de tratamento corrobora a hipótese de dano subletal cumulativo, caracterizado por lesões irreversíveis que levam à morte celular tardia. Esse comportamento reforça que a eficácia antimicrobiana do plasma frio deve ser avaliada não apenas imediatamente após o tratamento, mas também durante todo o armazenamento, uma vez que o efeito bactericida residual representa uma vantagem distinta da descontaminação baseada em plasma em comparação com outras tecnologias não térmicas (Zhang; Zhang; Han, 2023).

A resposta de *Salmonella* aos tratamentos com plasma frio foi comparável à da *E. coli*, com reduções mais acentuadas em suspensões microbianas do que na matriz vegetal (Tabela 3). Em suspensão, as células foram totalmente expostas às espécies reativas, resultando em inativações próximas a 7 log em todos os tempos de armazenamento. Nas folhas de agrião, no entanto, a topografia da superfície, a presença de compostos antioxidantes e a formação de microambientes protegidos limitaram a eficácia do plasma, levando a reduções mais heterogêneas e, em alguns casos, menos persistentes (Tabela 3).

Além disso, as superfícies das folhas apresentam naturalmente rachaduras e fendas que atuam como nichos protetores, além da internalização bacteriana dentro das estruturas estomáticas, conforme relatado em estudos anteriores, o que reduz a acessibilidade das espécies reativas e contribuindo para persistência microbiana. Esse padrão destaca que a eficiência antimicrobiana do plasma frio depende não apenas da intensidade do tratamento, mas também da complexidade estrutural e química do substrato, que pode abrigar microrganismos em microambientes protegidos (Pontes *et al.*, 2026).

5.3 Aplicação de um modelo matemático para explicar a eficiência de inativação durante o tratamento com plasma de descarga luminosa

5.3.1 *E.coli*

Os dados experimentais foram descritos utilizando os modelos de Weibull e Peleg (Eq. 1 e 2) para *E.coli*, que dependeu do comportamento de inativação observado para cada condição de plasma (Tabela 4). O modelo de Weibull ajustou-se adequadamente ao tratamento F10T20 ($R^2 = 0,86$), indicando inativação microbiana rápida e irreversível, caracterizada por um tempo característico muito baixo ($\delta < 0,1$). Esse comportamento sugere dano oxidativo severo e perda da integridade celular, consistente com a inativação completa observada experimentalmente.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos modelos de Weibull e Peleg ajustados aos dados de inativação microbiana de *E. coli* sob diferentes condições de plasma de descarga luminosa

Tratamentos	Modelo	R ²	a (Taxa de inativação)	b (Coeficiente de resistência)	c (Taxa de recuperação)	Interpretação Biológica
F10T10	Peleg	0,93	1000	455,10	-0,002	Estável
F10T15	Peleg	0,79	1000	620,61	-0,013	Inativação contínua
F10T20	Weibull	0,86	($\delta < 0,1$)	-	-	-
F20T10	Peleg	0,99	0,533	0,07	+0,037	Crescimento
F20T15	Peleg	0,99	0,27	0,021	+0,038	Crescimento
F20T20	Peleg	0,96	0,38	0,05	-0,012	Inativação contínua
F30T10	Peleg	0,99	0,27	0,18	+0,075	Crescimento
F30T15	Peleg	0,99	0,88	0,21	+0,021	Crescimento
F30T20	Peleg	0,97	0,44	0,09	-0,010	Inativação contínua

Valores que atingem o limiar de otimização (> 1000) indicam uma taxa de inativação inicial instantânea em relação à escala de amostragem experimental.

Fonte: elaborado pela autora.

Em contraste, a maioria dos tratamentos com plasma foi melhor descrita pelo modelo de Peleg ($R^2 = 0,79-0,99$), indicando respostas microbianas não lineares durante o armazenamento refrigerado e destacando a relevância dos fenômenos de resistência e recuperação. O parâmetro (a) está associado à taxa inicial de inativação, refletindo a intensidade do efeito letal imediato pós-tratamento, enquanto (b) descreve a resistência microbiana, controlando a curvatura da resposta e a aproximação a um platô. Valores elevados de (a) e (b)

(>900) e (>100) indicam uma inativação mais rápida nas primeiras horas, resultante da tentativa do modelo em ajustar uma transição de morte, na qual a população microbiana atinge alta inativação da população microbiana no primeiro intervalo de contagem (24 h).

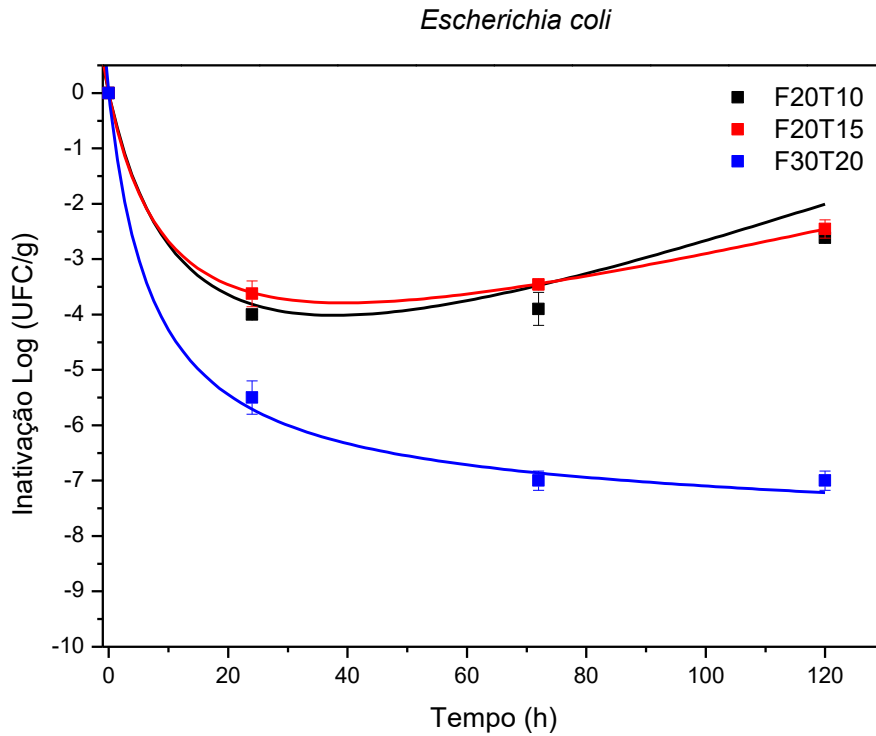
Tratamentos como F10T10 foram caracterizados por altos coeficientes de inativação (a) combinados com parâmetros de recuperação negativos (c), resultando em um perfil microbiano estável ao longo do tempo (Tabela 4). Por outro lado, condições como F10T15, F20T20 e F30T20 exibiram taxas de inativação mais baixas e coeficientes de recuperação negativos, embora pequenos, correspondendo a um declínio lento e progressivo na resposta microbiana durante o armazenamento. Tratamentos realizados com taxas de fluxo de gás mais altas (20 e 30 mL/min), particularmente em tempos de exposição mais curtos, mostraram coeficientes de recuperação positivos ($c > 0$), indicando recrescimento microbiano parcial ou recuperação metabólica. Esse comportamento sugere a persistência de células subletalmente danificadas, capazes de recuperação sob condições de refrigeração (Tabela 4).

Em geral, esses resultados demonstram que o plasma de descarga luminosa pode induzir tanto inativação irreversível quanto lesão subletal, dependendo da interação entre a vazão de gás e o tempo de tratamento. Vazões de gás mais baixas podem favorecer o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de longa duração, promovendo danos oxidativos sustentados e supressão microbiana, enquanto vazões mais altas podem reduzir o tempo de residência do plasma, limitando a interação das espécies reativas e permitindo a recuperação celular durante o armazenamento.

A Figura 7 ilustra os dados experimentais e as curvas ajustadas pelo modelo para *Escherichia coli* sob condições selecionadas de plasma de descarga luminosa, escolhidas para representar diferentes comportamentos microbianos pós-tratamento durante o armazenamento refrigerado. As condições F20T10, F20T15 e F30T20 foram selecionadas como casos representativos devido às suas respostas contrastantes, permitindo uma visualização clara dos efeitos da vazão de gás e do tempo de tratamento na dinâmica microbiana. Uma redução imediata na população de *E. coli* foi observada em todas as condições, indicando um forte impacto inicial da exposição ao plasma. No entanto, comportamentos divergentes emergiram durante o armazenamento. Os tratamentos F20T10 e F20T15 mostraram uma diminuição inicial seguida por um aumento gradual na contagem microbiana, sugerindo recuperação parcial ou recrescimento de células subletalmente lesadas. Em contraste, a condição F30T20 exibiu um declínio pronunciado e sustentado ao longo do armazenamento, consistente com dano oxidativo aumentado e inativação irreversível. A estreita concordância entre os pontos experimentais e as

curvas ajustadas confirma a adequação dos modelos matemáticos aplicados na descrição do comportamento não linear da *E. coli* após o tratamento.

Figura 7 – Dados experimentais e curvas ajustadas ao modelo que descrevem o comportamento microbiano da *E. coli* após o tratamento com plasma de descarga luminosa durante o armazenamento refrigerado



Fonte: elaborado pela autora.

5.3.2 *S. Typhimurium*

Os dados experimentais para *Salmonella Typhimurium* foram predominantemente bem descritos pelo modelo de Peleg (Eq. 2), com altos coeficientes de determinação ($R^2 = 0,90-0,99$) (Tabela 5), indicando comportamento microbiano não linear durante o armazenamento refrigerado após o tratamento com plasma de descarga luminosa. No modelo de Peleg, o parâmetro (a) representa a taxa inicial de resposta, (b) está associado à resistência e a curvatura, e (c) determina a direção da resposta microbiana durante o armazenamento.

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo de Peleg ajustados aos dados de inativação microbiana de *S. Typhimurium* sob diferentes condições de plasma de descarga luminosa

Tratamentos	Modelo	R ²	a (Taxa de inativação)	b (Coeficiente de resistência)	c (Taxa de recuperação)	Interpretação Biológica
F10T10	Peleg	0,97	999,99	516,02	-0,041	Inativação contínua
F10T15	Peleg	0,94	1000	477,62	-0,038	Inativação contínua
F10T20	Peleg	0,99	0,79	0,15	+0,011	Recuperação leve
F20T10	Peleg	0,99	0,29	0,02	+0,040	Estável/crescimento
F20T15	Peleg	0,95	999,99	262,84	+0,001	Estável
F20T20	Peleg	0,99	999,99	331,83	-0,009	Estável
F30T10	Peleg	0,99	3,57	0,814	+0,009	Crescimento
F30T15	Peleg	0,98	999,99	244,30	+0,018	Crescimento
F30T20	Peleg	0,90	999,99	245,74	+0,012	Crescimento

Valores que atingem o limiar de otimização (> 1000) indicam uma taxa de inativação inicial instantânea em relação à escala de amostragem experimental.

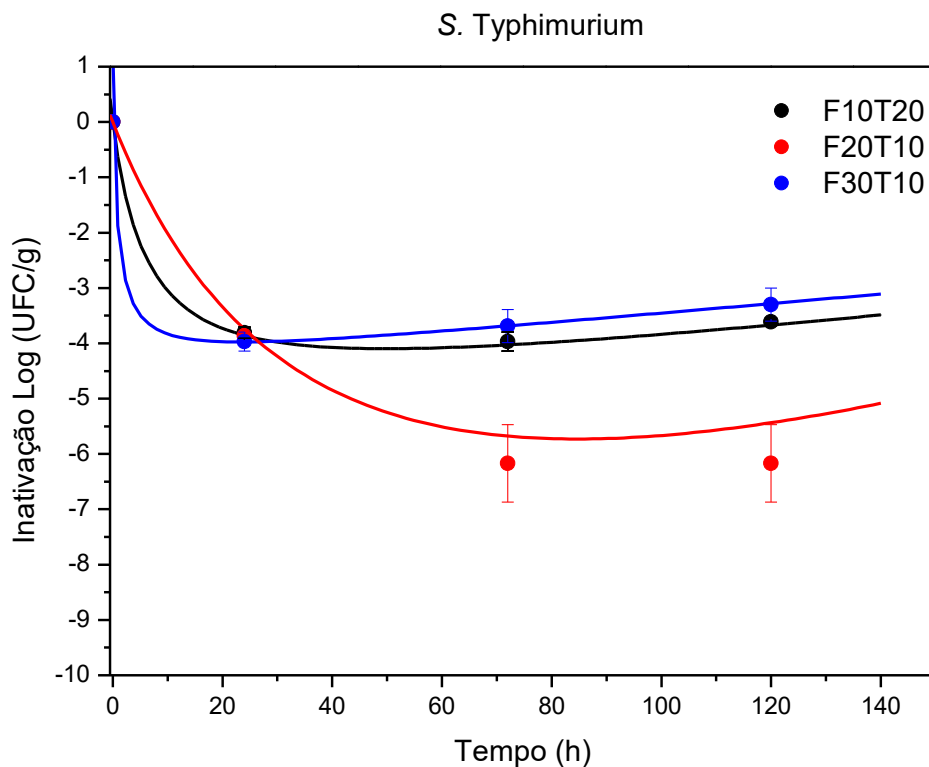
Fonte: elaborado pela autora.

No presente estudo, a obtenção de valores elevados de (a) e (b) em diversos tratamentos está relacionada à baixa variação das contagens microbianas, indicando que a população de *Salmonella* permaneceu próxima a um patamar ao longo do período avaliado. Nesses casos, os valores elevados desses parâmetros refletem uma limitação do ajuste matemático, decorrente da ausência de uma cinética de inativação bem definida, e não um aumento real da resistência microbiana ou uma rápida inativação. Por sua vez, o parâmetro (c) mostrou-se determinante para a interpretação biológica, permitindo distinguir claramente entre condições de inativação contínua, estabilidade e recuperação microbiana durante a estocagem.

Os tratamentos realizados com baixas taxas de fluxo de gás (F10T10 e F10T15) resultaram em inativação contínua, conforme indicado pelos coeficientes de recuperação negativos, refletindo uma forte supressão da atividade microbiana ao longo do armazenamento. Condições intermediárias, como F10T20, F20T15 e F20T20, mostraram comportamento estável ou recuperação leve, sugerindo adaptação celular parcial ou sobrevivência de populações subletalmente lesadas (Tabela 5). Por outro lado, tratamentos realizados com taxas de fluxo de gás mais altas (30 mL/min) promoveram a recuperação ou crescimento microbiano, como evidenciado por coeficientes de recuperação positivos. Esse comportamento indica que taxas de renovação de gás mais altas possivelmente reduziram o tempo de residência e o acúmulo de espécies reativas de longa duração, limitando o dano oxidativo e permitindo mecanismos de reparo celular.

A Figura 8 ilustra os dados experimentais e as curvas de ajuste para *Salmonella Typhimurium* sob condições selecionadas de plasma de descarga luminosa, escolhidas para representar os distintos padrões de resposta microbiana observados em todos os tratamentos. As condições F10T20, F20T10 e F30T10 foram selecionadas como casos representativos de estabilização microbiana, inativação contínua e recuperação pós-tratamento, respectivamente, permitindo uma comparação gráfica dos efeitos induzidos pelo plasma durante o armazenamento refrigerado.

Figura 8 – Dados experimentais e curvas ajustadas ao modelo que descrevem o comportamento microbiano da *S. Typhimurium* após o tratamento com plasma de descarga luminosa durante o armazenamento refrigerado



Fonte: elaborado pela autora.

Uma rápida redução inicial na contagem de células viáveis foi observada em todos os tratamentos, refletindo o impacto antimicrobiano imediato da exposição ao plasma. Na condição F20T10, essa redução inicial foi seguida por uma diminuição sustentada na população microbiana ao longo do armazenamento, indicando inativação contínua e capacidade limitada de reparo celular. Em contraste, o tratamento F10T20 exibiu uma redução inicial seguida pela estabilização dos níveis microbianos, sugerindo adaptação parcial ou a persistência de células

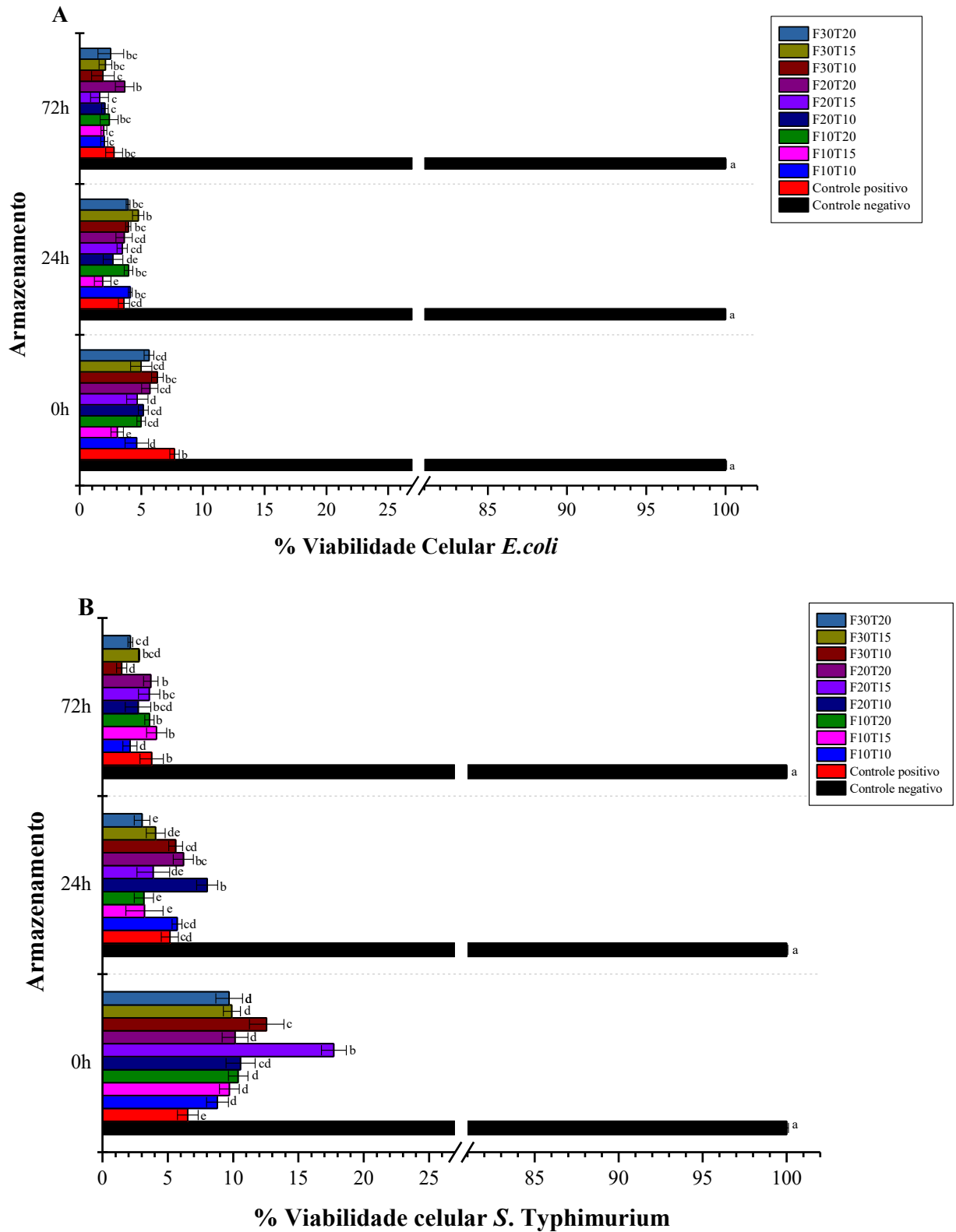
subletalmente danificadas. Em contraste, a condição F30T10 apresentou um aumento progressivo na contagem microbiana ao longo do tempo de armazenamento, consistente com a recuperação ou recrescimento celular, em concordância com o coeficiente de recuperação positivo estimado pelo ajuste do modelo de Peleg. A estreita concordância entre as observações experimentais e as curvas ajustadas confirma a adequação dos modelos matemáticos aplicados na descrição do comportamento microbiano não linear durante o armazenamento.

5.4 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT

A atividade metabólica de *E. coli* e *S. Typhimurium* foi observada em até 72 h, após o processamento das suspensões microbiana objetivando comprovar a eficácia de inativação do plasma frio. A aplicação de plasma frio por descarga luminosa resultou em diminuições acentuadas na atividade metabólica tanto para *S. Typhimurium* quanto para *E. coli*, conforme determinado pelo ensaio MTT (fig. 9). Para *S. Typhimurium* (fig. 9B), os valores de viabilidade variaram de aproximadamente $17,71 \pm 0,94\%$ em 0 h para $1,46 \pm 0,39\%$ em 72 h, correspondendo até 98% de inativação de células metabolicamente ativas em comparação com o controle não tratado (100%). *E. coli* (fig. 9A) exibiu uma resposta inicial ainda mais forte, com viabilidade abaixo de $7,68 \pm 0,38\%$ em 0 h, reduzindo para $1,60 \pm 0,72\%$ em 72 h, indicando uma supressão sustentada da atividade metabólica durante o armazenamento.

Em ambas as espécies, a atividade metabólica foi maior em 0 h do que em tempos posteriores (24 e 72 h), o que pode ser parcialmente explicado pela presença de compostos reativos residuais derivados do plasma que interagem quimicamente com o sal de tetrazólio (MTT). Após 24 h e 72 h, os valores de viabilidade permaneceram baixos e relativamente estáveis entre os tratamentos, e nenhuma célula cultivável foi recuperada em meios seletivos, confirmando que o plasma frio eliminou efetivamente *S. Typhimurium* e *E. coli*. A pequena atividade residual de MTT observada nas amostras tratadas e mesmo no controle positivo inativado pelo calor (~7% em 0 h e 3% em 72 h) reflete uma redução não enzimática do tetrazólio ou de compostos redutores liberados e a possível presença de células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC), que retêm atividade redox mínima, mas não conseguem proliferar em condições padrão de cultivo (Pazos-Rojas *et al.*, 2023; Schottroff *et al.*, 2018).

Figura 9 – Efeito do tratamento com plasma de descarga luminosa e do tempo de armazenamento na viabilidade metabólica pelo ensaio MTT: (A) *Escherichia coli* e (B) *S. Typhimurium*



Fonte: elaborado pela autora.

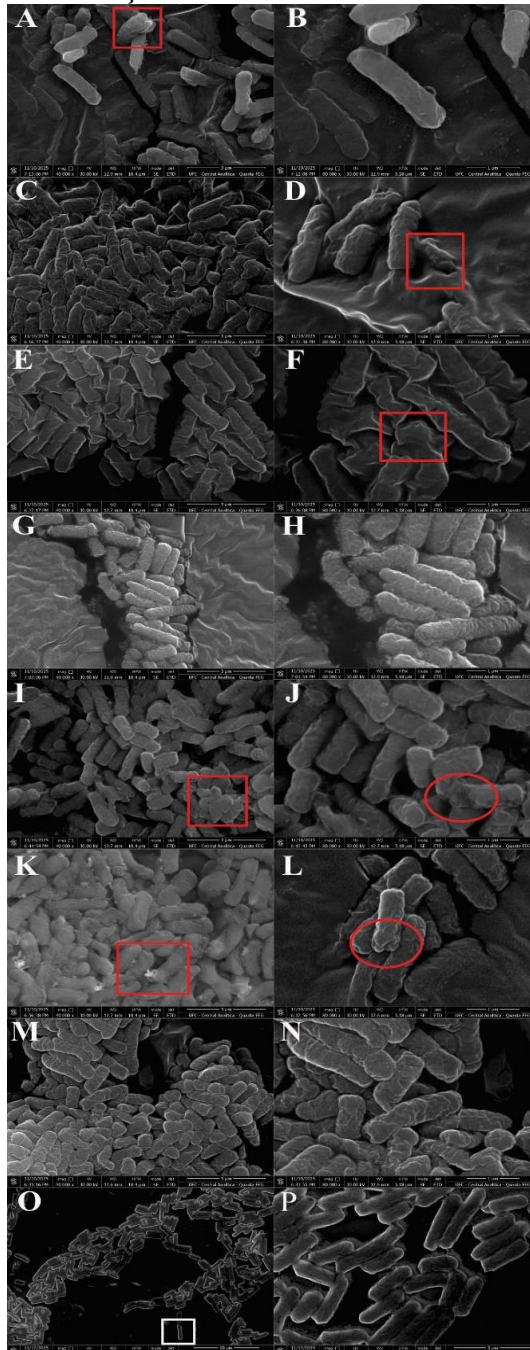
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

5.4.1 *E. coli*

Para entender como o plasma frio afetou a estrutura celular da *E. coli*, imagens de MEV (microscopia eletrônica de varredura) de células não tratadas e tratadas foram examinadas (fig. 10). As células não tratadas apresentaram a morfologia típica, lisa e bem preservada, em forma de bastonete, enquanto as células tratadas com plasma exibiram extensa deterioração física, incluindo envoltórios colapsados, superfícies irregulares e abundantes detritos celulares ao redor dos remanescentes. Essas características indicam perda irreversível de viabilidade e integridade estrutural.

Em consonância com as reduções microbianas observadas nos resultados, as alterações morfológicas nas colônias de *E. coli* após os tratamentos com plasma (fig. 10) e as alterações na pigmentação reforçam ainda mais o efeito deletério do plasma frio na integridade celular. Fenômenos semelhantes foram relatados por Dezest et al. (2017), indicando que essa tecnologia pode atingir múltiplos componentes celulares, afetando não apenas a viabilidade, mas também a morfologia microbiana. A condição que induziu o dano estrutural mais pronunciado em *E. coli* foi F10T20 (E, F), o que é consistente com os resultados de inativação microbiológica em amostras de agrião inoculadas com o patógeno, onde esse tratamento alcançou redução completa em todos os tempos de armazenamento avaliados. Notavelmente, condições de fluxo de gás mais elevado em tempos mais curtos resultaram em menor ruptura morfológica, provavelmente devido a um menor tempo de residência das espécies reativas de RONS (Prasad et al., 2017).

Figura 10 – Micrografias eletrônicas de varredura de células de *Escherichia coli* submetidas ao plasma de descarga luminosa sob diferentes condições de fluxo e tempo. As células de controle não tratadas estão representadas por (O, P). As células tratadas com plasma nas condições F10T10 (A, B), F10T15 (C, D), F10T20 (E, F), F20T15 (G, H), F20T20 (I, J), F30T15 (K, L) e F30T20 (M, N). Os painéis à esquerda (A, C, E, G, I, K, M, O) correspondem a imagens com menor ampliação, enquanto os painéis à direita (B, D, F, H, J, L, N, P) mostram imagens com maior ampliação das mesmas condições.



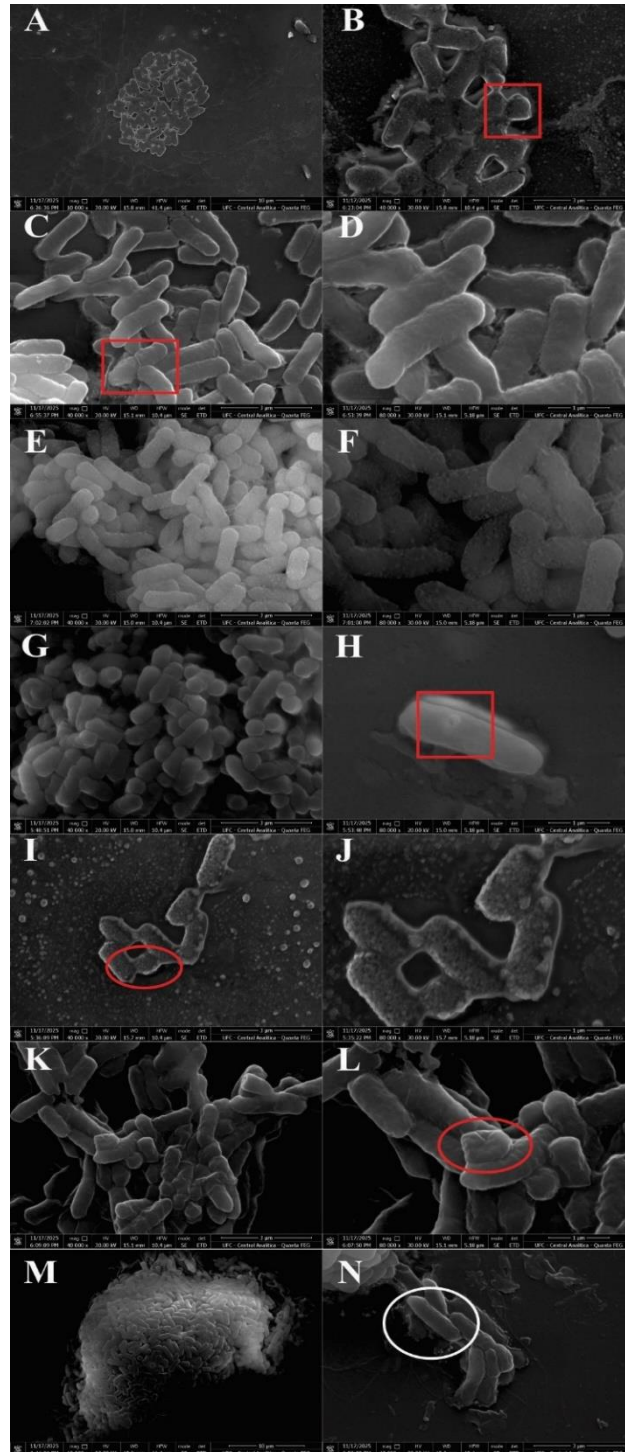
Fonte: elaborado pela autora.

5.4.2 *S. Typhimurium*

O efeito de diferentes condições de fluxo e tempo de plasma na morfologia celular de *Salmonella Typhimurium* é apresentado na figura 11. Os painéis M–N mostram as células não tratadas, que mantiveram o formato típico de bastonete liso e alongado, com estruturas superficiais intactas e sem sinais de encolhimento ou deformação da membrana. Em contraste, a exposição ao plasma frio causou alterações morfológicas progressivas, dependendo dos parâmetros de tratamento aplicados. No tratamento F10T10 (A, B), a *S. Typhimurium* apresentou encolhimento celular, acompanhado por uma camada densa, semelhante a uma crosta, na superfície, sugerindo o acúmulo de detritos celulares resultantes de danos induzidos pelo plasma. Sob F10T15 (C, D), a redução de tamanho permaneceu evidente, com bastonetes mais curtos e de formato irregular, indicando estresse estrutural. Na condição F10T20 (E, F), além da diminuição do comprimento celular, as células exibiram uma aparência murcha e colapso superficial parcial (fig. 11). Essa contração é consistente com as respostas ao estresse oxidativo, onde as células bacterianas expostas a espécies reativas reduzem sua área de superfície como uma estratégia adaptativa, um fenômeno relatado anteriormente para *C. freundii* Surowsky et al. (2014) e *S. aureus* Han et al. (2016) submetidos a tratamentos com plasma frio.

Na condição F20T10 (G, H), além da redução no tamanho da célula, fissuras distintas foram observadas na parede celular, evidenciadas pelo colapso pronunciado de células individuais na imagem H. Para F20T20 e F30T15 (I, J e K, L), as células não apenas mostraram uma redução no comprimento, mas também uma transição gradual de morfologias em forma de bastonete para mais arredondadas, sugerindo intensa contração e reorganização do envelope celular (fig. 11). Resultados semelhantes foram relatados por Lv e Cheng (2022), que demonstraram que a exposição ao plasma frio induz a contração das células de *S. Typhimurium* e propuseram que essa contração pode estar relacionada à pressão oxidativa gerada por espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pelo plasma.

Figura 11 – Micrografias eletrônicas de varredura de células de *Salmonella* Typhimurium submetidas a plasma de descarga luminosa sob diferentes condições de fluxo e tempo. As células de controle não tratadas (M, N). As células tratadas com plasma nas condições F10T10 (A, B), F10T15 (C, D), F10T20 (E, F), F20T10 (G, H), F20T20 (I, J) e F30T15 (K, L). Os painéis à esquerda (A, C, E, G, I, K, M) correspondem a imagens com menor ampliação, enquanto os painéis à direita (B, D, F, H, J, L, N) mostram imagens com maior ampliação das mesmas condições.



Fonte: elaborado pela autora.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a descarga de plasma frio é uma intervenção não térmica eficaz para reduzir a presença de *S. Typhimurium* e *E. coli* em agrião, embora sua eficácia dependa fortemente da combinação da vazão de gás e do tempo de exposição. Dentre as condições testadas, independente da vazão de gás, tempos de exposição mais longo foram os mais eficazes para *E. coli*, levando à sua completa inativação no agrião. Para *S. Typhimurium*, vazões mais baixas e tempos de exposição mais curtos foram mais eficazes. Quando testada apenas em suspensão, a inativação foi alcançada em todas as condições para ambos microrganismos.

Alterações estruturais nas células bacterianas, incluindo encolhimento, colapso da membrana e rachaduras na superfície, indicam que o principal mecanismo de ação envolve a ruptura oxidativa da parede celular. Essas descobertas corroboram o potencial do plasma frio como uma estratégia promissora de descontaminação para hortaliças folhosas frescas. Trabalhos futuros devem se concentrar na ampliação do processo, na avaliação da viabilidade industrial e na otimização dos parâmetros operacionais, bem como na integração do plasma frio com outras tecnologias para aumentar a eficácia antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ALBERTOS, I. *et al.* Shelf-life extension of herring (*Clupea harengus*) using in-package atmospheric plasma technology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], vol. 53, p. 85–91, 2019.
- ALVES, J. M. *et al.* Predicting the impact of temperature and relative humidity on *Salmonella* growth and survival in sliced chard, broccoli and red cabbage. **Food Microbiology**, [s. l.], vol. 120, p. 104495, 2024.
- ANUNTAGOOL, J. *et al.* A review on dielectric barrier discharge nonthermal plasma generation, factors affecting reactive species, and microbial inactivation. **Food Control**, [s. l.], vol. 153, p. 109913, 2023.
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; CORRADINI, M. G. Inactivation kinetics of *Salmonella* spp. under thermal and emerging treatments: A review. **Food Research International**, [s. l.], vol. 45, n° 2, p. 700–712, 2012.
- BEZERRA, J. de A. *et al.* Cold plasma as a pre-treatment for processing improvement in food: A review. **Food Research International**, [s. l.], vol. 167, p. 112663, 2023.
- BLAND, R. *et al.* Probing antimicrobial resistance and sanitizer tolerance themes and their implications for the food industry through the *Listeria monocytogenes* lens. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], vol. 21, n° 2, p. 1777–1802, 2022.
- BOURKE, P. *et al.* The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], vol. 36, n° 6, p. 615–626, 2018.
- CAI, R. *et al.* Inactivation activity and mechanism of pulsed light against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores in concentrated apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], vol. 413, 2024.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Food Safety Basics**. 2025. Disponível em: <https://www.cdc.gov/food-safety/about/index.html>. Acesso em: 11 dez. 2025.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Summary of Possible Multistate Enteric (Intestinal) Disease Outbreaks in 2017–2020**. 2024a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodborne-outbreaks/php/data-research/summary-2017-2020.html>. Acesso em: 11 dez. 2025.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella Outbreak Linked to Fresh Basil, April 2024**. 2024b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks/basil-04-24/index.html>. Acesso em: 11 dez. 2025.
- CHEN, F. *et al.* Assessing the risk of *E. coli* contamination from manure application in Chinese farmland by integrating machine learning and Phytodrus. **Environmental Pollution**, [s. l.], vol. 356, 2024.

CHIZOBA EKEZIE, F.-G.; SUN, D.-W.; CHENG, J.-H. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], vol. 69, p. 46–58, 2017.

DEZEST, M. *et al.* Oxidative modification and electrochemical inactivation of *Escherichia coli* upon cold atmospheric pressure plasma exposure. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 12, n° 3, 2017.

DHARINI, M.; JASPIN, S.; MAHENDRAN, R. Cold plasma reactive species: Generation, properties, and interaction with food biomolecules. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 405, p. 134746, 2023.

DONNISON, A.; ROSS, C.; DIXON, L. Faecal microbial contamination of watercress (*Nasturtium officinale*) gathered by a Māori protocol in New Zealand streams. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, [s. l.], vol. 43, n° 4, p. 901–910, 2009.

FÀBREGA, A.; VILA, J. Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], vol. 26, n° 2, p. 308–341, 2013.

FAN, X.; VINYARD, B. T.; SONG, Y. Cold plasma-activated hydrogen peroxide aerosols inactivate *Salmonella Typhimurium* and *Listeria innocua* on smooth surfaces and stem scars of tomatoes: Modeling effects of hydrogen peroxide concentration, treatment time and dwell time. **Food Control**, [s. l.], vol. 141, 2022.

FARDSANEI, F. *et al.* Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], vol. 12, p. 220–226, 2018.

FEIZOLLAHI, E.; MISRA, N. N.; ROOPESH, M. S. Factors influencing the antimicrobial efficacy of Dielectric Barrier Discharge (DBD) Atmospheric Cold Plasma (ACP) in food processing applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], vol. 61, n° 4, p. 666–689, 2021.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Cold Plasma Processing on Fruits and Fruit Juices: A Review on the Effects of Plasma on Nutritional Quality. **Processes**, [s. l.], vol. 9, n° 12, p. 2098, 2021.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Cold plasma technology for sustainable food production: meeting the United Nations sustainable development goals. **Sustainable Food Technology**, [s. l.], vol. 3, n° 1, p. 32–53, 2024.

FONTELES, T. V. *et al.* Metabolic responses of kombucha consortium fermentation upon ultrasound-processing. **Food Chemistry Advances**, [s. l.], vol. 4, 2024.

GALALY, A. R.; DAWOOD, N. Investigation of plasma parameters, distributions, and optical emission for the anti-microbial performance of non-woven fabric under direct current glow discharge. **Heliyon**, [s. l.], vol. 10, n° 2, p. e24490, 2024.

GAN, Z. *et al.* Cold plasma jet with dielectric barrier configuration: Investigating its effect on the cell membrane of *E. coli* and *S. cerevisiae* and its impact on the quality of chokeberry juice. **LWT**, [s. l.], vol. 136, 2021.

GOOGOOLEE, A. M. *et al.* Characterizing the cultivation practices and microbiological quality of watercress. **Journal of Agriculture and Food Research**, [s. l.], vol. 2, p. 100057, 2020.

HAN, L. *et al.* Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], vol. 82, n° 2, p. 450–458, 2016.

HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition**, [s. l.], vol. 4, n° 3, p. 250–255, 2018.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], vol. 44, n° 2, p. 121–129, 2001.

HEYBET, Z. *et al.* Animal-originated foods as Potential sources of multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* Pathotypes in Kayseri, Türkiye. **Food Control**, [s. l.], vol. 164, 2024.

JENKINS, C. *et al.* Public health investigation of two outbreaks of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with consumption of watercress. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], vol. 81, n° 12, p. 3946–3952, 2015.

KIM, J. H.; MIN, S. C. Moisture vaporization-combined helium dielectric barrier discharge-cold plasma treatment for microbial decontamination of onion flakes. **Food Control**, [s. l.], vol. 84, p. 321–329, 2018.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M. *et al.* Bioaccumulation of selected macro- and microelements and their impact on antioxidant properties and accumulation of glucosinolates and phenolic acids in in vitro cultures of *Nasturtium officinale* (watercress) microshoots. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 300, p. 125184, 2019.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M.; SZOPA, A.; EKIERT, H. Chemical composition, traditional and professional use in medicine, application in environmental protection, position in food and cosmetics industries, and biotechnological studies of *Nasturtium officinale* (watercress) – a review. **Fitoterapia**, [s. l.], vol. 129, p. 283–292, 2018.

KORKEALA, H.; KOSKELA, T.; JALAVA, K. Salmonella Typhimurium outbreak caused by contaminated chocolate highlights the importance of food hygiene and a socially responsible food chain. **Hygiene and Environmental Health Advances**, [s. l.], vol. 10, 2024.

LAROQUE, D. A. *et al.* Cold plasma in food processing: Design, mechanisms, and application. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], vol. 312, p. 110748, 2022.

LEE, E. S.; JEON, Y. J.; MIN, S. C. Microbial inactivation and quality preservation of chicken breast salad using atmospheric dielectric barrier discharge cold plasma treatment. **Foods**, [s. l.], vol. 10, n° 6, 2021.

LIU, M. *et al.* Recent advances in the degradation efficacy and mechanisms of mycotoxins in food by atmospheric cold plasma. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], vol. 270, p. 115944, 2024.

LOPES, S. J. S.; S. SANT'ANA, A.; FREIRE, L. Non-thermal emerging processing Technologies: Mitigation of microorganisms and mycotoxins, sensory and nutritional properties maintenance in clean label fruit juices. **Food Research International**, [s. l.], vol. 168, 2023.

LV, X.; CHENG, J.-H. Evaluation of the Effects of Cold Plasma on Cell Membrane Lipids and Oxidative Injury of *Salmonella typhimurium*. **Molecules**, [s. l.], vol. 27, n° 3, p. 640, 2022.

MAO, L. *et al.* Cold plasma: Microbial inactivation and effects on quality attributes of fresh and minimally processed fruits and Ready-To-Eat vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], vol. 116, p. 146–175, 2021.

MCCOY SANDERS, J. *et al.* Inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* using the Contamination Sanitization Inspection and Disinfection (CSI-D) device. **Heliyon**, [s. l.], vol. 10, n° 9, p. e30490, 2024.

MCGLYNN, W. **Guidelines for the Use of Chlorine Bleach as a Sanitizer in Food Processing Operations Use of chlorine bleach for sanitizing equipment and food handling articles**. Stillwater: [s. d.], [s. d.].

MELO, A. N. F. de *et al.* Genomic investigation of antimicrobial resistance determinants and virulence factors in *Salmonella enterica* serovars isolated from contaminated food and human stool samples in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], vol. 343, p. 109091, 2021.

MIGUEL, T. B. A. R. *et al.* Toxic effect of plasma and ultrasound activated cashew apple juice in *Artemia salina* nauplii. **Food Bioscience**, [s. l.], vol. 53, 2023.

MISRA, N. N.; SCHLÜTER, O.; CULLEN, P. J. Plasma in Food and Agriculture. **Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications**, [s. l.], p. 1–16, 2016.

MORAIS, J. S. de *et al.* Effects of different cold plasma treatments on chemical composition, phenolics bioaccessibility and microbiota of edible red mini-roses. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 460, p. 140522, 2024.

MORASI, R. M. *et al.* Overview of antimicrobial resistance and virulence factors in *Salmonella* spp. isolated in the last two decades from chicken in Brazil. **Food Research International**, [s. l.], vol. 162, 2022.

NICOL, M. K. J. *et al.* Antibacterial effects of low-temperature plasma generated by atmospheric-pressure plasma jet are mediated by reactive oxygen species. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 10, n° 1, 2020.

NIVEDITHA, A. *et al.* Application of cold plasma and ozone technology for decontamination of *Escherichia coli* in foods- a review. **Food Control**, [s. l.], vol. 130, p. 108338, 2021.

NURJAYADI, M. *et al.* Detection of the *Salmonella typhi* bacteria in contaminated egg using real-time PCR to develop rapid detection of food poisoning bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], vol. 20, 2019.

OH, Y. J.; HONG, J. Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems. **LWT**, [s. l.], vol. 153, p. 112565, 2022.

OLATUNDE, O. O.; SHIEKH, K. A.; BENJAKUL, S. Pros and cons of cold plasma technology as an alternative non-thermal processing technology in seafood industry. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], vol. 111, p. 617–627, 2021.

PARACINI, N. *et al.* Lipopolysaccharides at Solid and Liquid Interfaces: Models for Biophysical Studies of the Gram-negative Bacterial Outer Membrane. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], vol. 301, p. 102603, 2022.

PAZOS-ROJAS, L. A. *et al.* The Viable but Non-Culturable (VBNC) State, a Poorly Explored Aspect of Beneficial Bacteria. **Microorganisms**, [s. l.], vol. 12, n° 1, p. 39, 2023.

PERINBAN, S. *et al.* Effect of plasma activated water on *Escherichia coli* disinfection and quality of kale and spinach. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 397, p. 133793, 2022.

PINELA, J. *et al.* Suitability of gamma irradiation for preserving fresh-cut watercress quality during cold storage. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 206, p. 50–58, 2016.

POHL, P. *et al.* Do we need cold plasma treated fruit and vegetable juices? A case study of positive and negative changes occurred in these daily beverages. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 375, p. 131831, 2022.

PONTES, E. D. S. *et al.* Efficacy of cold plasma and pulsed UV-light against *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 on fresh basil leaves. **Food Microbiology**, [s. l.], vol. 135, p. 104976, 2026.

PRASAD, P. *et al.* Effect of atmospheric cold plasma (ACP) with its extended storage on the inactivation of *Escherichia coli* inoculated on tomato. **Food Research International**, [s. l.], vol. 102, p. 402–408, 2017.

RAMOS, B. *et al.* Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s. l.], vol. 20, p. 1–15, 2013.

RANI, A. *et al.* Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], vol. 349, p. 109233, 2021.

RAO, A. P.; PRADHAN, A. K.; PATEL, J. Transfer of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* to microgreens and soil from contaminated seeds. **Journal of Agriculture and Food Research**, [s. l.], vol. 21, p. 101761, 2025.

SAREMNEZHAD, S. *et al.* Chemical changes of food constituents during cold plasma processing: A review. **Food Research International**, [s. l.], vol. 147, p. 110552, 2021.

SCHOTTROFF, F. *et al.* Sublethal Injury and Viable but Non-culturable (VBNC) State in Microorganisms During Preservation of Food and Biological Materials by Non-thermal Processes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], vol. 9, n° NOV, 2018.

SHAJI, S.; SELVARAJ, R. K.; SHANMUGASUNDARAM, R. Salmonella Infection in Poultry: A Review on the Pathogen and Control Strategies. **Microorganisms**, [s. l.], vol. 11, n° 11, p. 2814, 2023.

SILVA, G. B. L. *et al.* A sensitive gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for quantitative on-site detection of Salmonella in foods. **Microchemical Journal**, [s. l.], vol. 199, 2024.

SINGH, S. P.; THAKUR, R. Postharvest applications of cold plasma treatment for improving food safety and sustainability outcomes for fresh horticultural produce. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], vol. 209, p. 112694, 2024.

SODAGARI, H. R. *et al.* A Review of the Public Health Challenges of Salmonella and Turtles. **Veterinary Sciences**, [s. l.], vol. 7, n° 2, p. 56, 2020.

SUBRAHMANYAM, K. *et al.* Cold plasma-mediated inactivation of microorganisms for the shelf-life extension of animal-based foods: Efficiency, mechanism of inactivation, and impact on quality attributes. **Food Control**, [s. l.], vol. 162, p. 110464, 2024.

SUDARSAN, A.; KEENER, K. M. Inactivation of Salmonella enterica serovars and Escherichia coli O157:H7 surrogate from baby spinach leaves using high voltage atmospheric cold plasma (HVACP). **LWT**, [s. l.], vol. 155, p. 112903, 2022.

SUN, T. *et al.* The Prevalence and Epidemiology of Salmonella in Retail Raw Poultry Meat in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Foods**, [s. l.], vol. 10, n° 11, p. 2757, 2021.

SUROWSKY, B. *et al.* Impact of cold plasma on Citrobacter freundii in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], vol. 174, p. 63–71, 2014.

TAHI, A. A. *et al.* Ultrasound and heat treatment effects on Staphylococcus aureus cell viability in orange juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], vol. 78, 2021.

TAVARES, J. de L. *et al.* Salmonella enterica in thinly sliced carrots and zucchini survives better at higher temperatures and higher relative humidity conditions. **Food Research International**, [s. l.], vol. 219, p. 116998, 2025.

TRANTAPHYLLIDOU, I. E.; AGGELOPOULOS, C. A. Insights on bacteria inactivation in water by cold plasma: Effect of water matrix and pulsed plasmas waveform on physicochemical water properties, species formation and inactivation efficiency of Escherichia coli. **Environmental Research**, [s. l.], vol. 266, 2025.

WANG, S. *et al.* Temperate phage influence virulence and biofilm-forming of Salmonella Typhimurium and enhance the ability to contaminate food product. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], vol. 398, 2023.

WANG, X. *et al.* Removal of Alternaria mycotoxins exposed to different food components by cold plasma. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 397, 2022.

XU, D. *et al.* Prevalence and Serotyping of Salmonella in Retail Food in Huzhou China. **Journal of Food Protection**, [s. l.], vol. 87, n° 2, 2024.

XU, W. *et al.* An improved MTT colorimetric method for rapid viable bacteria counting. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], vol. 214, p. 106830, 2023.

YANG, X.; KEENER, K. M.; CHENG, J. H. Enhancing the discharge uniformity of atmospheric pressure DBD cold plasma for food efficient microbial inactivation. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], vol. 388, p. 112389, 2025.

YANG, Y. *et al.* Inactivation of antibiotic resistant Escherichia coli and degradation of its resistance genes by glow discharge plasma in an aqueous solution. **Chemosphere**, [s. l.], vol. 252, 2020.

YOST, A. D.; JOSHI, S. G. Atmospheric nonthermal plasma-treated PBS inactivates Escherichia coli by oxidative DNA damage. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 10, n° 10, 2015.

ZAMAN, S. *et al.* Polyphenolic contents and antioxidant potential in Nasturtium officinale. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], vol. 36, n° 6, p. 103223, 2024.

ZHANG, H.; ZHANG, C.; HAN, Q. Mechanisms of bacterial inhibition and tolerance around cold atmospheric plasma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], vol. 107, n° 17, p. 5301–5316, 2023.

ZHAO, D. *et al.* β -Galactosidase-triggered in situ synthesis of yellow emitting silicon nanoparticle and its application in visual detection of E. coli O157:H7 and drug susceptibility test. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 450, 2024.

ZHU, T. *et al.* Strategies for controlling biofilm formation in food industry. **Grain & Oil Science and Technology**, [s. l.], vol. 5, n° 4, p. 179–186, 2022.

ZIUZINA, D. *et al.* Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for Salmonella enterica serovar Typhimurium, Listeria monocytogenes and Escherichia coli. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], vol. 210, p. 53–61, 2015.

ZIUZINA, D. *et al.* Investigation of a large gap cold plasma reactor for continuous in-package decontamination of fresh strawberries and spinach. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], vol. 59, 2020.