



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA HARUMI NIGUMA

**APLICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FERMENTADOS  
ACÉTICOS NA DESINFECÇÃO DE ALIMENTOS DE ORIGEM  
VEGETAL**

---

Londrina  
2018

NATÁLIA HARUMI NIGUMA

**APLICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FERMENTADOS  
ACÉTICOS NA DESINFECÇÃO DE ALIMENTOS DE ORIGEM  
VEGETAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa Dra Tereza Cristina Rocha  
Moreira de Oliveira

Coorientadora: Profa Dra Wilma Aparecida  
Spinosa

Londrina  
2018

NATÁLIA HARUMI NIGUMA

**APLICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FERMENTADOS  
ACÉTICOS NA DESINFECÇÃO DE ALIMENTOS DE ORIGEM  
VEGETAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa Dra Tereza Cristina Rocha  
Moreira de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa Dra Jane Martha Graton Mitcha  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Profa Dra Renata Katsuko Takayama Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa Dra Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa Dra Adriana Bosso Tomal  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, de 04 de dezembro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família,  
que com todo o amor, me ajudou nesta  
conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela felicidade desta conquista.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira pelos seus ensinamentos, pelo incentivo para que eu sempre buscasse o meu melhor e sobretudo pela sua amizade.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wilma Aparecida Spinosa pelo apoio dado durante a elaboração deste trabalho e pela sua amizade.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Ao Prof. Dr. Mário Killner e prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata K. T. Kobayashi pelas valiosas sugestões concedidas no exame de qualificação.

À Prof. Dra. Eliana Vespero por doar as cepas bacterianas padrão utilizadas neste estudo.

A Érica Pelegrin Figueiredo do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do CCB, UEL, pela atenção e disponibilidade em me ajudar no laboratório.

Ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveria Júnior pelas orientações e pela enorme disponibilidade em ajudar na coleta de imagens em microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL.

Ao técnico Osvaldo Capelo e ao Gustavo Manoel Teixeira do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL pela ajuda na coleta das eletromicrografias.

À estagiária Amanda Gabriel Fernandes pelo auxílio na execução das atividades laboratoriais.

Aos professores do programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CCA/UEL), pela colaboração.

Aos colegas de curso, em especial, Fernanda Henrique Bana, Ariana Justus Murate, Andrea Santos Iark, Francine Fernandes da Silva, Fábio Martins Campos, Fernanda Farinazzo, Maria Thereza Fernandes, Carolina Saori, José Renato da Silva, Alessandra Bosso, Adriana B. Tomal, Bruna Yoshida, Cíntia Handa, Julyene Francisco, Rodolfo Zanin e Mariah Benine, por tornarem os momentos em sala de aula, no laboratório, no RU e reuniões de turma inesquecíveis.

Aos meus pais, Rubens e Silvana, pelo amor, confiança e incentivo.

À minha irmã Mariani, por sempre me incentivar.

Aos meus queridos, Silvia, Heberth e Rafael, pelo carinho e pelo apoio dados principalmente na reta final deste trabalho.

Ao meu esposo, Gustavo, pelo amor, apoio e compreensão.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim.

E a todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

*“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”*

Marie Curie

NIGUMA, Natália Harumi. **Aplicação de ácidos orgânicos e fermentados acéticos na desinfecção de alimentos de origem vegetal**. 2018. 92 f. Tese de doutorado (Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A água clorada é amplamente utilizada para a desinfecção de frutas e hortaliças, mas a reação do cloro com a matéria orgânica resulta na formação de compostos carcinogênicos. Em alguns países europeus, o seu uso é proibido, e por isso a sua eliminação dos processos de desinfecção de alimentos tornou-se uma tendência. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a uso dos ácidos orgânicos e de vinagres na desinfecção de hortifrutícolas. Primeiramente, as concentrações inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas do ácido acético (AA), do ácido láctico (AL) e dos vinagres de maçã e de mel orgânicos em relação às bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* ser. Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* foram determinadas de acordo com o preconizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). A CIM do AA e do AL foi de 2,5 e 10 g/L para todos os microrganismos testados, respectivamente, exceto *S. Enteritidis*, que teve CIM e CBM iguais a 1,25 e 5,0 g/L para AA. Em relação aos vinagres de maçã e de mel orgânicos, CIM e CBM foram iguais a 5,0 e 10 g/L, respectivamente, para todas as bactérias estudadas. Posteriormente, os vinagres de maçã e de mel orgânicos foram utilizados como desinfetantes para alimentos naturalmente contaminados, e seus resultados foram comparados aos obtidos com a solução de hipoclorito de sódio. Amostras de tomate cereja, salsa, alface e pepino japonês foram desinfetados com soluções de vinagres de maçã e de mel orgânicos a 23 % (v/v) e solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L. Um ensaio controle foi realizado com água destilada esterilizada para verificar o efeito do enxágue na redução da contaminação. Para a avaliação do efeito das soluções desinfetantes foi realizada a contagem total de aeróbios mesófilos (AM) antes e após a descontaminação dos alimentos. Além disso, foi realizada a observação das amostras de alface em microscópio eletrônico de varredura para a avaliação das características topológicas da superfície do alimento. As imagens reforçaram os resultados observados nas contagens totais de AM, sendo que todos os procedimentos de desinfecção testados reduziram consideravelmente a contaminação microbiana. As soluções de vinagres de maçã e de mel orgânicos foram eficazes na remoção da contaminação presente naturalmente nos alimentos. Ambos os tratamentos e a solução de hipoclorito de sódio alcançaram reduções, em média de 2 ciclos log ( $p < 0,05$ ), na contagem total de AM em amostras de tomate cereja e salsa. Para as amostras de alfaces as soluções de vinagres tiveram resultados superiores aos obtidos com hipoclorito de sódio. Já as amostras de pepino japonês foram as mais difíceis de desinfetar, e todos os tratamentos de desinfecção testados tiveram resultados semelhantes ao enxágue com água. Buscando melhorar a atividade antimicrobiana dos vinagres, foi proposta a mistura destes com o ácido láctico. Para tanto, foi empregada a metodologia da AOAC 965.13 (*Association of Official Analytical Chemists*) que é preconizada pela legislação brasileira para a avaliação de produtos desinfetantes para hortifrutícolas. A ação dessas soluções na desinfecção de alimentos foi avaliada em amostras de tomate cereja, salsa, alface e pepino japonês artificialmente contaminadas com suspensões de *E. coli* e *E. faecalis* (7 log

UFC/mL), como representantes das bactérias Gram-negativas e positivas. Sete diferentes soluções de ácidos orgânicos, denominadas A (AL 15 g/L), B (AA glacial 15 g/L), C (AA glacial 15 g/L + AL 10 g/L), D (AA 15 g/L + AL 15 g/L), E (vinagre 15 g/L acidez), F (vinagre 15 g/L acidez + AL 10 g/L) e G (vinagre 15 g/L acidez + AL 15 g/L), e uma solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L, denominada H, foram avaliadas. A solução de cloro quando testada em meio de cultura eliminou *E. coli* e *E. faecalis* em menos de 1 minuto, porém no procedimento de desinfecção dos alimentos, apresentou eficiência inferior às soluções de ácidos orgânicos. As formulações C e F apresentaram os melhores resultados, pois reduziram a contagem de *E. coli* e *E. faecalis*, em média 4 e 2 log UFC/g, respectivamente ( $p < 0,05$ ). O ensaio *checkerboard* mostrou que a mistura do ácido acético e láctico tem efeito aditivo sobre a inativação das bactérias. Os resultados do presente trabalho indicaram que é possível substituir o cloro por soluções de ácidos orgânicos na desinfecção de alimentos, porém a escolha do método de desinfecção deve ser criteriosamente avaliada. Procedimentos eficazes para um tipo de alimento podem não alcançar bons resultados em outro tipo de alimento, uma vez que as características da superfície dos vegetais têm importante influência para a atividade dos desinfetantes.

**Palavras-chave:** Ácido acético. Ácido láctico. Hipoclorito de sódio. Vinagre de maçã orgânico. Vinagre de mel orgânico. Ensaio *checkerboard*. Descontaminação.

NIGUMA, Natália Harumi. **Organic acids and vinegar solutions for vegetables disinfection**. 2018. 92 f. Tese de doutorado (Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of organic acids and vinegars for vegetables disinfection. First, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of acetic acid (AA), lactic acid (LA) and organic apple cider vinegar and organic honey vinegar against to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* ser. Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). The MIC and MBC values for all tested microorganisms treated with AA and LA were 2.5 and 10 g/L, respectively, except for *S. Enteritidis*, which values were 1.25 and 5.0 g/L with AA. Regarding to organic apple cider vinegar and organic honey vinegar, MIC and MBC were equal to 5.0 and 10 g/L, respectively, for all bacteria studied. After that, organic apple cider vinegar and organic honey vinegar were used as disinfectants for naturally contaminated foods, and their results were compared to those obtained with sodium hypochlorite solution. Samples of tomatoes, parsley, lettuce and cucumber were disinfected with organic apple cider vinegar and organic honey vinegar solutions at 23% (v/v) and sodium hypochlorite solution 0.2 g/L. The assay control was performed with sterile water to verify the effect of the rinsing for reduction of the contamination. Total counts of mesophilic aerobes were carried out before and after the vegetables decontamination for the evaluation of the effect of disinfectant solutions. Vinegar solutions were effective in removing naturally contamination in food. Both treatments (apple cider and honey vinegars) and sodium hypochlorite solution achieved reductions, on average of 2 log cycles, of total count of mesophilic aerobes on tomato and parsley samples. Vinegar solutions had better results for lettuce samples than those obtained with sodium hypochlorite. Cucumber samples were the most difficult food to disinfect, and all disinfection procedures had similar results to water rinsing. For improving the antibactericidal activity of vinegars, lactic acid was combined to them. For such purpose, the AOAC 965.13 (Association of Official Analytical Chemists) assay was performed. This technique is recommended by the Brazilian legislation for evaluation of vegetables disinfectants. The bactericidal efficiency of these solutions was evaluated using tomato, lettuce, parsley, and cucumber samples artificially contaminated with *E. coli* and *E. faecalis* suspensions. Seven organic acid solutions, namely, solution A (15 g/L LA), solution B (15 g/L AA), solution C (15 g/L AA + 10 g/L LA), solution D (15 g/L AA + 15 g/L LA), solution E (vinegar solution containing 15 g/L AA), solution F (10 g/L LA + vinegar solution containing 15 g/L AA), and solution G (15 g/L LA + vinegar solution containing 15 g/L AA), and a chlorine solution containing 0.2 g/L sodium hypochlorite (solution H) were tested. Solution H killed *E. coli* and *E. faecalis* in culture media in less than 1 min; however, it was less efficient than organic acid solutions in reducing bacterial counts in foods. Solutions C and F reduced *E. coli* and *E. faecalis* counts in food samples by 4 and 2 log CFU/g, respectively. The results indicate that it is possible to use organic acid solutions instead of chlorine solutions for disinfecting fresh produce, however the disinfection method should be very well evaluated. Effective procedures for one type of food may not achieve good results for another

food, since the surface characteristics of food have a relevant influence on the disinfectant activity.

**Key words:** Acetic acid. Lactic acid. Sodium hypochlorite. Apple cider vinegar. Honey vinegar. Checkerboard assay. Decontamination.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Material e Métodos

- Figura 1** – Ilustração da microplaca para determinação da concentração inibitória e bactericida mínima.....34
- Figura 2** – Ilustração da microplaca para o ensaio *checkerboard* .....36

### Artigo 2

- Figura 1** – Número de aeróbios mesófilos em alimentos naturalmente contaminados, após os diferentes procedimentos de desinfecção .....53
- Figura 2** – Eletromicrografias de amostras de pepino submetidas aos diferentes procedimentos de desinfecção .....54
- Figura 3** – Eletromicrografias de amostras de alface submetidas aos diferentes procedimentos de desinfecção .....56
- Figura 4** – Eletromicrografias de amostras de salsinha submetidas aos diferentes procedimentos de desinfecção .....57
- Figura 5** – Eletromicrografias de amostras de tomate cereja submetidas aos diferentes procedimentos de desinfecção .....58

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1</b> – Surto envolvendo alimentos de origem vegetal ocorridos nos Estados Unidos entre 2016 e 2018 .....	18
---	----

### MATERIAL E MÉTODOS

<b>Tabela 2</b> – Acidez volátil, fixa e total de vinagres utilizados para a preparação das soluções desinfetantes .....	37
<b>Tabela 3</b> – Soluções desinfetantes e os valores de pH.....	41

### ARTIGO I

<b>Tabela 1</b> – Acidez volátil, fixa e total dos vinagres utilizados para a preparação das soluções desinfetantes .....	49
<b>Tabela 2</b> – Redução da contagem total de aeróbios mesófilos, em termos de log N/No, após a desinfecção ou imersão em água, em alimentos naturalmente contaminados.....	52

### ARTIGO II

<b>Table 1</b> – Disinfectants solutions and their pH values .....	65
<b>Table 2</b> – MIC values of acetic and lactic acids againsts Gram-Positive and Gram- Negative bacteria .....	69
<b>Table 2</b> – Exposure time required to inactivate <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> in BHI broth using disinfectant solutions .....	70
<b>Table 3</b> – Antibacterial activities of solutions C, F, H, and sterile water in artificially contaminated foods .....	72

### ANEXO A

<b>Tabela 1</b> – Valores de CIM e CIF do ácido acético e ácido láctico em relação as diferentes cepas bacterianas .....	91
--	----

### ANEXO B

<b>Tabela 1</b> – Concentração inibitória e bactericida mínima dos fermentados acéticos em relação as diferentes cepas bacterianas .....	92
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
°C	Grau Celsius
°G	Gay Lussac
AA	Ácido acético
A/E	Lesões <i>Attaching/effacement</i>
AIEC	<i>E. coli</i> Aderente invasiva
AL	Ácido láctico
AM	Aeróbios mesófilos
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APT	Água Peptonada Tamponada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
CBM	Concentração bactericida mínima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIF	Concentração inibitória fracionada
Cl <sub>2</sub>	Gás cloro
CMH	Caldo Müller-Hinton
DAEC	<i>E. coli</i> de Aderência Difusa
BOD	Demanda biológica de oxigênio
DEC	<i>E. coli</i> diarreiogênica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
EPECt	<i>E. coli</i> Enteropatogênica típica

EPECa	<i>E. coli</i> Enteropatogênica atípica
ES	Estado do Espírito Santo
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
g/L	Gramma por litro
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
h	Horas
HAA	Ácido haloacético
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
ka	Constante de dissociação do ácido
K <sub>2</sub> CR <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Dicromato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilogramas
KI	Iodeto de potássio
Log	Logaritmo
LT	Toxina termolábil
M	Molar
mg/L	Miligramma por litro
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mol	Massa molar
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Tiosulfato de sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	Tiosulfato de sódio pentahidratado
OCl <sup>-</sup>	Íons hipoclorito
OMS	Organização Mundial da Saúde
pka	Inverso da constante de dissociação do ácido
pH	Potencial hidrogeniônico
PPM	Partes por milhão

PR	Estado do Paraná
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional da Vigilância Sanitária
s	Segundos
SE	Toxina estafilocócica
SE/	Toxina estafilocócica- <i>like</i>
SHU	Síndrome Hemolítico-Urêmica
SP	Estado de São Paulo
ST	Toxina termoestável
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TA	Temperatura ambiente
THM	Trihalometanos
TSST-1	Enterotoxina estafilocócica do choque tóxico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/cm <sup>2</sup>	Unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado
UFC/g	Unidades formadoras de colônias por grama
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Segurança microbiológica de frutas e hortaliças .....	17
3.2 Desinfecção de frutas e hortaliças .....	19
3.3 Cloro na desinfecção de frutas e hortaliças.....	22
3.4 Ácidos orgânicos na desinfecção de frutas e hortaliças .....	23
3.5 Vinagre .....	25
3.6 Microrganismos de interesse neste estudo .....	26
3.7 Adesão microbiana à superfície dos alimentos .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Determinação da acidez total .....	32
4.2 Determinação da acidez volátil e fixa dos vinagres estudados .....	32
4.3 Cepas bacterianas padrão .....	32
4.4 Preparo do inóculo bacteriano.....	33
4.5 Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima dos ácidos orgânicos.....	33
4.6 Determinação da concentração inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínima dos fermentados acéticos .....	34
4.7 Ensaio <i>checkerboard</i> .....	35
4.8 Avaliação da eficiência das soluções de vinagres de maçã e mel orgânicos e da água sanitária na desinfecção de diferentes alimentos naturalmente contaminados	36
4.8.1 Preparação das amostras de alimentos .....	36
4.8.2 Preparo das soluções desinfetantes .....	37
4.8.3 Titulação da solução de hipoclorito de sódio.....	38
4.8.4 Descontaminação dos vegetais .....	39
4.8.5 Contagem total dos aeróbios mesófilos (AM).....	39
4.8.6 Análise estatística .....	39

4.8.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	40
4.9 Determinação da atividade bactericida das soluções a base de ácidos orgânicos e vinagres em relação às cepas de <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> , segundo AOAC 965.13 .....	40
4.9.1 Preparo das diferentes soluções desinfetantes .....	40
4.9.3 Determinação da atividade bactericida das diferentes soluções desinfetantes .....	42
4.10 Avaliação da eficiência das soluções desinfetantes em amostras de alimentos artificialmente contaminados .....	42
4.10.1 Preparação das amostras de alimentos .....	42
4.10.2 Contaminação das amostras de alimentos .....	43
4.10.3 Desinfecção dos alimentos e enumeração de <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> .....	43
4.10.4 Análise estatística .....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>Artigo I - Eficácia dos vinagres de maçã e mel orgânicos na redução da contaminação microbiana natural de vegetais .....</b>	<b>46</b>
<b>Artigo II - Comparison of the efficiency of chlorine and organic acid solutions in reducing <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> in food .....</b>	<b>63</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumo de alimentos frescos de origem vegetal cresceu devido ao interesse dos consumidores por um estilo de vida mais saudável. Concomitantemente, o número de surtos associados a estes alimentos também aumentou (CHANG; FANG, 2007), e conseqüentemente a preocupação em produzir alimentos frescos microbiologicamente seguros.

A água clorada é amplamente utilizada para a desinfecção de frutas e hortaliças, mas a reação do cloro com a matéria orgânica resulta na formação de compostos carcinogênicos, como os trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (HAAs) (HUA; RECKHOW, 2007). Em alguns países europeus, o seu uso é proibido inclusive na produção agrícola convencional, e por isso a sua eliminação dos processos de desinfecção de alimentos tornou-se uma tendência (ÖLMEZ & KRETZCHMAR, 2009).

O elevado número de surtos de doenças relacionadas ao consumo de frutas e hortaliças levantou dúvidas a respeito da eficiência do cloro na desinfecção dos alimentos. Além disso, tem sido relatado que algumas cepas de microrganismos apresentam resistência à ação do cloro (PARISH et al., 2003; ZABOT et al., 2018). Desta forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de novos desinfetantes e procedimentos de higienização de frutas e hortaliças. Esses produtos e procedimentos precisam, além de serem eficientes na inativação de patógenos e de microrganismos deteriorantes, manter a qualidade sensorial desses produtos (BERMÚDEZ-AGUIRRE; BARBOSA-CÁNOVAS, 2013). Diversos estudos têm comprovado a eficácia de outros desinfetantes em substituição ao cloro, como ultrassom, ácidos orgânicos, ozônio, peróxido de hidrogênio, irradiação, entre outros (GIL et al., 2009; PARISH et al., 2003).

Os ácidos orgânicos, tais como, os ácidos acético, cítrico e láctico constituem uma alternativa ao uso do cloro, pois podem reduzir a contaminação microbiana de alimentos (CHANG; FANG, 2007). Esses ácidos por serem naturalmente encontrados em frutas e produtos fermentados têm sido estudados como potenciais agentes de desinfecção de vegetais (AKBAS; ÖLMEZ, 2007). Os ácidos orgânicos levam à morte celular microbiana devido às diferentes reações intracelulares, tais como rompimento da membrana plasmática, inibição de reações metabólicas, estresse homeostático e acúmulo de ânions tóxicos (BRUL; COOTE,

1999).

Outra alternativa interessante é o vinagre, que é um produto fermentado que apresenta o ácido acético como principal ácido orgânico da sua composição. A sua eficiência como desinfetante para frutas e hortaliças tem sido estudada (CHANG; FANG, 2007; SENGUN; KARAPINAR, 2004; VIJAYAKUMAR; WOLF-HALL, 2002). Tradicionalmente o vinagre resulta da fermentação acética do vinho. Outros líquidos alcoólicos, porém, podem ser submetidos à fermentação acética, e são denominados de fermentados acéticos, podendo ser usada a palavra vinagre no rótulo, desde que seja acrescida o nome da matéria-prima que lhe deu origem (AQUARONE, BORZANI, SCHMIDELL, & LIMA, 2001).

Atualmente, diversas matérias-primas são utilizadas para a obtenção de vinagres, como maçã, kiwi, laranja, milho, mel, entre outros (MARQUES et al., 2010). Os vinagres obtidos de frutas ou de malte possuem composição mais complexa que o vinagre de álcool por conter praticamente todas as substâncias solúveis existentes na matéria-prima ou que se formaram nos processos fermentativos (AQUARONE, BORZANI, SCHMIDELL, & LIMA, 2001). Os vinagres de frutas são superiores sensorial e nutricionalmente quando comparados a outros tipos de vinagres, porque apresentam vitaminas, proteínas, aminoácidos e outros ácidos orgânicos além do ácido acético. Vinagres de frutas produzidas pelo sistema de cultivo orgânico aparentemente apresentam uma maior diversidade de ácidos orgânicos em relação aos vinagres de frutas produzidas pelo sistema convencional (MARQUES et al., 2010).

Neste contexto, o presente trabalho buscou elucidar a possibilidade da aplicação dos ácidos orgânicos e dos fermentados acéticos, bem como a combinação deles, na desinfecção de vegetais naturalmente e artificialmente contaminados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso dos ácidos orgânicos e fermentados acéticos produzidos a partir de diferentes matérias-primas na desinfecção de hortifrutícolas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos ácidos orgânicos em relação às bactérias *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da combinação dos ácidos acético glacial e láctico.
- Avaliar a eficácia dos ácidos orgânicos e fermentados acéticos na desinfecção de frutas e hortaliças artificialmente e naturalmente contaminadas.
- Avaliar a mistura dos ácidos acético e láctico, e a mistura do fermentado acético de maçã como alternativa ao uso de hipoclorito de sódio na desinfecção de hortaliças.
- Utilizar a microscopia eletrônica de varredura na avaliação do perfil de aderência das bactérias na superfície dos alimentos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Segurança microbiológica de frutas e hortaliças

Os vegetais podem se contaminar durante a produção e colheita no campo, no pós-colheita, na manipulação ou na distribuição (OLIVEIRA et al., 2010). Nos Estados Unidos, a proporção de surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a vegetais crus aumentou de 0,7 % nos anos 1970 para 6 % nos anos 1990 (SIVAPALASINGAM et al., 2004; BERGER et al., 2010). Muitos surtos têm sido associados ao consumo de frutas e hortaliças frescas. Alguns desses surtos envolveram patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* O157:H7 (CDC, 2018), como mostra a tabela 1.

Painter e pesquisadores (2013) avaliaram os surtos de doenças de origem alimentar ocorridos nos Estados Unidos, entre os anos de 1998 e 2008 e os tipos de alimentos envolvidos. Os pesquisadores relataram que, anualmente, os alimentos de origem vegetal foram responsáveis por 51 % das doenças, seguido pelos alimentos de origem animal (42 %) e os pescados (6 %). Aproximadamente 74 % dos casos de doenças veiculadas pelos alimentos de origem vegetal foram causados por vírus, 24 % por bactérias e 1,4 % por parasitas. Os vegetais folhosos foram relacionados a 22 % dos casos de doenças, 14 % das hospitalizações e 6 % das mortes.

Entre 2010 e 2014, 120 surtos de doenças transmitidas por alimentos foram registrados nos Estados Unidos. Cinquenta e um desses surtos foram relacionados ao consumo de alimentos como frutas (17), legumes (15), brotos (10) e sementes (9) (INATSU et al., 2017).

*Salmonella* foi o patógeno bacteriano responsável por metade dos surtos relacionados a produtos frescos ocorridos nos Estados Unidos e União Europeia (SIVAPALASINGAM et al., 2004). *S. Typhimurium* e *S. Newport* foram os sorovares mais frequentemente envolvidos nos surtos nos Estados Unidos. Por outro lado, na União Europeia, *S. Enteritidis* foi o sorovar mais comum, seguido por *S. Newport* (CALLEJÓN et al., 2015).

Surtos de *E. coli* e *Campylobacter* spp. foram mais prevalentes nos Estados Unidos do que na União Europeia. *E. coli* O157 foi o sorogrupo mais prevalente, e entre os alimentos mais envolvidos, destacam-se diferentes vegetais

frescos, frutas e brotos, especialmente alface e sucos de maçã não pasteurizados (CALLEJÓN et al., 2015).

**Tabela 1** - Surtos envolvendo alimentos de origem vegetal ocorridos nos Estados Unidos entre 2016 e 2018.

<b>Alimento (microrganismo)</b>	<b>Nº de infectados</b>	<b>Nº de hospitalizações</b>	<b>Nº de óbitos</b>	<b>Ano</b>
<b>Broto de alfafa</b> ( <i>E. coli</i> O157)	11	2	-	2016
<b>Broto de alfafa</b> ( <i>S. Reading</i> e <i>S. Abony</i> )	36	7	-	2016
<b>Vegetais congelados</b> ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	9	9	3	2016
<b>Pistache</b> ( <i>S. Montevideo</i> e <i>S. Senftenberg</i> )	11	2	-	2016
<b>Broto de alfafa</b> ( <i>S. Muenchen</i> e <i>S. Kentucky</i> )	26	8	-	2016
<b>Mix de folhas</b> ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	19	19	1	2016
<b>Folhas verdes</b> ( <i>E. coli</i> O157:H7)	25	9	1	2017
<b>Mamão papaia</b> ( <i>S. Urbana</i> )	7	4	-	2017
<b>Mamão papaia</b> ( <i>S. Newport</i> e <i>S. Infantis</i> )	4	2	-	2017
<b>Mamão papaia</b> ( <i>S. Anatum</i> )	20	5	1	2017
<b>Mamão papaia</b> ( <i>S. Thompsom</i> , <i>S. Kiambu</i> , <i>S. Agona</i> , <i>S. Gaminara</i> e <i>S. Senftenberg</i> )	220	68	1	2017
<b>Melão e melancia</b> ( <i>S. Adelaide</i> )	77	36	-	2018
<b>Coco desidratado</b> ( <i>S. Typhimurium</i> )	14	3	-	2018
<b>Brotos crus</b> ( <i>S. Montevideo</i> )	10	-	-	2018
<b>Coco congelado</b> ( <i>S. Newport</i> )	27	6	-	2018

Fonte: Dados obtidos do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Estados Unidos) (CDC, 2018).

Um grande surto de síndrome hemolítico-urêmica causada por *E. coli* O104:H4 ocorreu na Alemanha e em outros países da Europa, nos Estados Unidos e no Canadá em 2011. Foram notificados, em toda a Europa, mais de 4 mil casos de diarreia, com aproximadamente 900 casos de síndrome hemolítico-urêmica

e 48 óbitos. Segundo os estudos epidemiológicos, a fonte primária de transmissão nesse surto foi brotos de alfafa (BUCHHOLZ et al., 2011; CVE, 2011).

Entre 2000 e 2017, *Salmonella* spp. foi responsável por aproximadamente 30 % e *E. coli* por 24 % dos surtos ocorridos no Brasil. As frutas e hortaliças foram responsáveis por 1,08 % e 0,7 % desses surtos, respectivamente (SVS, 2018). O número de casos e surtos envolvendo estes microrganismos, provavelmente, é muito maior, visto que muitas vezes não são notificados aos órgãos de vigilância sanitária.

A contaminação de frutas e hortaliças pode ocorrer através da água, do ar, do solo, de insetos vetores, equipamentos e pela manipulação inadequada por parte dos manipuladores. A adesão microbiana a superfícies em contato com os alimentos ao longo da cadeia produtiva pode levar a formação de biofilmes e subsequente contaminação do produto final. A internalização de patógenos também pode ocorrer e já foi relatada a capacidade de *S. Typhimurium* e *E. coli* penetrar nas folhas de alface (KROUPITSKI et al., 2011; MEIRELES; GIAOURIS; SIMÕES, 2016). A internalização pode ocorrer através dos estômatos, do sistema vascular da planta, de cortes, fissuras, etc (ERICKSON, 2012).

Outra questão importante a ser alertada é a relação complexa entre os microrganismos patogênicos e a microbiota natural nos alimentos. O controle ou a redução da microbiota natural pela lavagem e desinfecção, ou pelo uso de embalagens com atmosfera modificada, leva à diminuição da competição por espaço e nutrientes, o que, conseqüentemente, pode favorecer a multiplicação dos patógenos (PARISH et al., 2003).

### **3.2 Desinfecção de frutas e hortaliças**

A higienização tem como primeira etapa a limpeza, com a remoção de resíduos orgânicos. A segunda etapa é a desinfecção com a redução, por método físico e ou agente químico, do número de microrganismos a um nível que não comprometa a segurança do alimento (BRASIL, 2002).

A limpeza e a desinfecção de frutas e hortaliças são importantes para reduzir a contaminação microbiana, diminuir a deterioração, melhorar a aparência e aumentar o prazo de validade desses produtos (MEIRELES; GIAOURIS; SIMÕES, 2016). A lavagem é um processo crítico para o preparo de alimentos

frescos e, principalmente, para a indústria de alimentos minimamente processados (prontos para o consumo), pois é a única etapa que pode remover sujidades e inativar patógenos (GIL et al., 2009; LUO et al., 2018).

Características dos vegetais e do próprio microrganismo podem interferir na ação dos desinfetantes. Entre essas, destacam-se as características topográficas da superfície do vegetal, a natureza hidrofóbica da superfície dos vegetais, que podem proteger os microrganismos dos agentes químicos, e as injúrias no tecido vegetal, que podem aprisionar os microrganismos e protegê-los. Em relação às características do próprio microrganismo, podem ser citadas a adesão à superfície do vegetal e o nível da contaminação microbiana (FERNANDES, 2013; GIL et al., 2009; VELÁZQUEZ et al., 2009). Além disso, devem ser levados em conta o tempo de contato entre o desinfetante e o alimento, a concentração ideal do agente desinfetante e o impacto sobre as características sensoriais do produto (PARISH et al., 2003).

A maioria dos procedimentos de lavagem são conduzidos pela imersão dos alimentos em recipientes com água, os quais podem ter recirculação e, ou reuso, devido às questões de custo e do impacto ambiental. Durante esse processo a contaminação cruzada pode ocorrer. Por isso, a presença de desinfetantes é muito importante para prevenir a sobrevivência dos patógenos na operação de lavagem (GIL et al., 2009; LUO et al., 2018).

Os microrganismos estão disseminados no ambiente de produção dos alimentos, e é inevitável que as frutas e hortaliças apresentem microrganismos em sua superfície. Esta microbiota natural, na maioria das vezes, é inofensiva, no entanto, a terra, a água, o esgoto, o ar e os animais no campo podem contaminar as superfícies dos vegetais com patógenos (BRENES, 2002). Além disso, existem os riscos de contaminação destes alimentos após a colheita, durante o transporte, o armazenamento, a venda e a preparação para o consumo.

A aplicação de Boas Práticas Agrícolas assim como as Boas Práticas de Produção são essenciais para prevenir a contaminação ou reduzir a microbiota presente na matéria-prima. Os agentes desinfetantes reduzem a contaminação microbiana inicial em média 100 vezes (CENCI, 2006).

A indústria de alimentos tem adotado várias técnicas de descontaminação ao longo da cadeia produtiva (NGNITCHO et al., 2017). A desinfecção ou sanitização pode ser realizada por métodos físicos ou agentes

químicos. Entre os métodos físicos destaca-se a aplicação de calor. A aplicação desse método no processamento mínimo de alimentos pode levar a perda de vitaminas e de minerais, formação de polímeros, alteração de textura e aroma, o que compromete a qualidade nutricional, sensorial e a característica de frescor do produto (FERNANDES, 2013; RICO et al., 2007). Outros métodos físicos chamados de emergentes, como ultrassom, aplicação de alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado de alta intensidade, radiação ultravioleta, entre outros, têm sido estudados (GIL et al., 2009) pela vantagem de não requisitar o aquecimento dos alimentos (FERNANDES, 2013).

Métodos químicos para limpeza e desinfecção de frutas e hortaliças, geralmente, envolvem a aplicação de lavagem mecânica na presença de desinfetantes, seguidos pelo enxágue com água potável. Uma grande variedade de procedimentos de descontaminação e de desinfetantes já foram avaliados (AKBAS; ÖLMEZ, 2007; ALLENDE et al., 2009; GIL et al., 2009; INATSU et al., 2005; LIN, CHIA-MIN, MOON SARAH, DOYLE MICHAEL, 2016).

Um agente sanitizante ou desinfetante ideal deve ter atividade antimicrobiana numa concentração que não afete a qualidade sensorial do produto (ALLENDE et al., 2009). Agentes antimicrobianos são frequentemente adicionados à água de lavagem de frutas e hortaliças para reduzir o número de microrganismos. Muitos desinfetantes e métodos de aplicação já foram avaliados para este propósito na indústria, como por exemplo, a aplicação de ácido peracético, de dióxido de cloro, de ozônio, de água eletrolisada e de cloro (NASTOU et al., 2012).

Alguns alimentos têm sua vida útil reduzida depois de umectados. Isso ocorre em alimentos com grandes superfícies de contato com a água, tais como, morangos e uvas. Tratamentos alternativos para esses alimentos devem ser usados para redução da sujidade como o uso de escovas, de jatos de ar e de acabamento, descartando-se folhas manchadas, raízes secundárias, produtos com defeitos e deteriorados. É importante lembrar que os desinfetantes atualmente disponíveis podem reduzir os contaminantes biológicos, mas não podem eliminá-los por completo (CENCI, 2006).

A preocupação com a lavagem de frutas e hortaliças não deve existir somente no ambiente de produção, mas deve se estender até o momento do consumo. A manipulação adequada dos alimentos no ambiente doméstico e nos serviços de alimentação pode manter o risco de contaminação a um nível seguro, ou

até reduzi-lo. Os ambientes em que os alimentos ficam expostos para venda também são importantes na prevenção da contaminação dos alimentos e/ou na sua disseminação (RAMOS, 2014).

### **3.3 Cloro na desinfecção de frutas e hortaliças**

Compostos clorados são amplamente utilizados para a redução da contagem de bactérias aderidas na superfície de frutas, legumes, hortaliças e sementes germinadas (RICO et al., 2007). As formas mais comuns do cloro livre incluem o cloro líquido e o hipoclorito. As concentrações geralmente utilizadas para a desinfecção da superfície dos alimentos e equipamentos são entre 50 e 200 ppm, com tempo de contato entre 1 e 2 min. (PARISH et al., 2003).

O hipoclorito de sódio quando adicionado à água, eleva o pH e gera o ácido hipocloroso. Esta molécula dissocia-se em íons hipoclorito ( $O^-Cl$ ) em pH superior a 7,5 (ARTÉS et al., 2009). O ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) é a forma do cloro residual livre que apresenta a maior atividade bactericida contra várias espécies de microrganismos, mesmo em concentrações menores que 0,1 mg/L (PARISH et al., 2003).

A maior eficiência de desinfecção do ácido hipocloroso em relação as outras formas de cloro é atribuída a sua forte capacidade oxidante, por liberar oxigênio na forma atômica, o qual combina com componentes do citoplasma da célula microbiana. O pequeno tamanho de sua molécula e a neutralidade elétrica permitem uma rápida penetração nas células. Dentro da célula reage com as proteínas e, altera o metabolismo microbiano (DENYER; STEWART, 1998; FERNANDES, 2013).

O uso do cloro apresenta algumas desvantagens como o odor, que geralmente desagrade os consumidores, e a necessidade de enxágue com água potável, após a desinfecção para a remoção do cloro residual livre. Além disso, o cloro reage com a matéria orgânica, que resulta na formação de subprodutos, como trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (HAA), que são carcinogênicos (HUA; RECKHOW, 2007; ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009; RICO et al., 2007)

O uso do cloro também é associado com a produção de altas quantidades de águas residuais com elevada demanda bioquímica de oxigênio (BOD) (ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009). Por isso, recentemente, a União Europeia

baniu o uso de desinfetantes a base de cloro para a lavagem de hortifrutícolas. O que incentivou a indústria e a comunidade científica a buscar novas técnicas e alternativas ao uso do cloro (INATSU et al., 2017).

Outra grande preocupação, é a eficiência antimicrobiana limitada da água clorada. A quantidade de cloro residual é inevitavelmente reduzida pela interação com a matéria orgânica e não tem efeito persistente. Estudos também mostram que a lavagem e o tratamento dos vegetais com o cloro não removem ou inativam completamente as bactérias dos alimentos frescos. As bactérias que sobrevivem à desinfecção, possivelmente, aderem a sítios que as protegem dos efeitos do cloro (BRACKETT, 1992; SEO; FRANK, 1999). Acredita-se que essa aderência microbiana na superfície hidrofóbica dos vegetais limita o contato entre a água clorada e os microrganismos contaminantes (DELAQUIS et al., 1999).

Alguns microrganismos patogênicos são resistentes à ação do cloro. Zobot e pesquisadores (2018) relataram que *S. Typhimurium* foi resistente ao dicloro isocianurato de sódio (60 mg/L) por até 20 min de exposição. Estudos têm demonstrado que, embora muito eficaz na eliminação de microrganismos em suspensão, o cloro não reduz mais que 2 ciclos logarítmicos a população microbiana de frutas e vegetais, nas concentrações recomendadas para essa finalidade (100-250 mg/L) (BEUCHAT, 1998; NASCIMENTO et al., 2003).

### **3.4 Ácidos orgânicos na desinfecção de frutas e hortaliças**

Os ácidos orgânicos fracos, como o ácido acético, o ácido sórbico, o ácido láctico e o ácido benzoico são exemplos de agentes conservantes. Essas moléculas inibem o desenvolvimento tanto de células bacterianas quanto fúngicas e, o ácido sórbico também inibe a germinação e multiplicação de esporos bacterianos (BRUL; COOTE, 1999).

Os ácidos orgânicos têm o potencial de dissociação, expresso em valores de pka, onde ka é a constante de dissociação e pka representa:  $-\log K_a$ . Este valor corresponde ao ponto de pH do meio em que há equilíbrio entre as formas dissociada e não dissociada da molécula. Quando pka é igual ao pH, teremos metade da fração dissociada e a outra metade da fração não dissociada, podendo haver interferência na ação bactericida dos ácidos orgânicos, pois quando não

dissociados são lipofílicos podendo difundir-se livremente através da membrana plasmática do microrganismo (FRANCO, 2009).

Portanto, acredita-se que a atividade inibitória se deve ao composto atravessar a membrana plasmática, e ao encontrar um pH mais elevado no interior da célula, a molécula se dissociará, resultando na liberação de ânions e cátions, os quais não atravessam a membrana. Em resumo, as moléculas dos ácidos orgânicos se difundem dentro da célula resultando no acúmulo de íons no interior da célula. Esses íons provocam diferentes reações que prejudicam o desenvolvimento dos microrganismos, como o rompimento da membrana plasmática, a inibição de reações metabólicas, estresse homeostático e o acúmulo de ânions tóxicos (BRUL; COOTE, 1999).

Os ácidos orgânicos são naturalmente encontrados numa grande variedade de frutas e alimentos fermentados. Eles são conhecidos por apresentar atividade bactericida e são reconhecidos como seguros (*Generally Recognized As Safe* - GRAS). No entanto, a atividade antimicrobiana varia dentre os diferentes ácidos orgânicos. O ácido acético mostrou atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*. O ácido láctico foi utilizado como desinfetante para inativação de *Aeromonas* em legumes e verduras minimamente processados. O ácido cítrico em suco de limão apresentou ação sobre *S. Typhimurium*, reduzindo sua população quando aplicado em frutas (AKBAS; ÖLMEZ, 2007a; BELL; CUTTER; SUMNER, 1997; DICKSON; ANDERSON, 1992; KARAPINAR; GÖNÜL, 1992).

Akbas e Ölmez (2007a) observaram que soluções de ácido láctico (5 g/L) ou de ácido cítrico (5 g/L) mostraram-se tão eficientes quanto a solução clorada (100 mg/L cloro livre) para a redução da população de *E. coli* e *L. monocytogenes* inoculadas em alfaces minimamente processadas. Um outro estudo, desenvolvido por esses mesmos autores, mostrou que as soluções de ácido láctico (5 g/L) ou ácido cítrico (5 g/L) foram mais eficientes que os tratamentos com água ozonizada (4 mg/L) e com solução clorada (100 mg/L) na desinfecção de alfaces minimamente processadas naturalmente contaminadas (AKBAS & ÖLMEZ, 2007b).

O uso de ácidos orgânicos é importante para o melhoramento da segurança dos alimentos frescos. Desinfetantes caseiros, tais como vinagre de maçã, suco de limão e vinagre de álcool reduzem o número de bactérias aeróbicas, sem causar prejuízos aos aspectos sensoriais dos alimentos (NASTOU et al., 2012).

O interesse das indústrias de alimentos no uso de vinagre, do ácido acético e do ácido peracético como desinfetantes tem aumentando em função das controvérsias sobre a toxicidade do cloro em alimentos.

### 3.5 Vinagre

O vinagre é definido como um alimento do grupo dos condimentos obtido por fermentação acética de soluções alcoólicas diluídas, sendo estas resultantes de fermentação alcoólica de mostos açucarados ou amiláceos. O vinagre é classificado como vinagre de vinho tinto ou de vinho branco, de acordo com a matéria-prima de origem. Os produtos resultantes da fermentação acética de outros líquidos alcoólicos são denominados de fermentados acéticos, podendo ser usada a palavra vinagre no rótulo, desde que seja acrescida do nome da matéria-prima que lhe deu origem. Exemplos: vinagre de álcool, vinagre de maçã, etc (AQUARONE, BORZANI, SCHMIDELL, & LIMA, 2001).

A legislação brasileira determina que o vinagre deve conter uma acidez volátil mínima de 40 g por litro expressa em ácido acético (4 %). Sua graduação alcoólica não pode exceder 1 °GL (Gay Lussac) e deve ser obrigatoriamente pasteurizado (AQUARONE, LIMA, & BORZANI, Vinagres, 1983).

A composição de um vinagre é bastante complexa, e contém outros ácidos, éteres, ésteres, corantes naturais, sais minerais e produtos oxigenados, conferindo-lhe sabor, odor e cor característicos, principalmente da matéria-prima de que se originou (AQUARONE, LIMA, & BORZANI, 1983).

A produção de vinagre consiste em dois processos microbiológicos sucessivos e completamente diferentes. Primeiramente, faz-se uma fermentação alcoólica, em anaerobiose utilizando uma levedura, geralmente *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse processo o uso de cultura pura é aconselhável para a obtenção de um produto final com aroma agradável. Em seguida, é realizada a fermentação acética, pelo uso de bactérias do gênero *Acetobacter* ou *Gluconobacter*, na presença de ar. Ao contrário da fermentação anterior, na fermentação acética emprega-se uma cultura mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades desta bactéria. O emprego de culturas puras fornece um produto inferior ao obtido por culturas mistas, e isso se deve, possivelmente, porque as espécies trabalham em simbiose (AQUARONE, LIMA, &

BORZANI, 1983).

As bactérias acéticas formam um grupo interessante de procaríotos. São aeróbios estritos que diferem da maioria dos demais microrganismos aeróbios, pois não oxidam compostos orgânicos completamente para dióxido de carbono e água. Assim, quando o etanol é fornecido como doador de elétron, ocorre a oxidação pela via das quinonas, e formação de ácido acético, o qual acumula no meio (MADIGAN, MARTINKO, & PARKER, 2002).

Os vinagres podem ser produzidos a partir de qualquer substância que contenha álcool, embora o material mais comumente usado seja vinho, cerveja e suco de maçã alcoólico (cidra). O vinagre pode ser obtido a partir de uma mistura de álcool puro e água, que neste caso é chamado de vinagre destilado (MADIGAN, MARTINKO, & PARKER, 2002).

### **3.6 Microrganismos de interesse neste estudo**

A infecção por *Salmonella* em humanos pode levar a gastroenterite autolimitada com sintomas brandos a moderados, incluindo náusea, vômito, febre, dor abdominal e diarreia. Sintomas clínicos mais graves podem ocorrer em casos de bacteremia ou febre entérica, os quais são caracterizados por cefaleia severa e febre alta, porém sem a manifestação da diarreia (LEADER et al., 2009).

*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são epidemiologicamente os sorovares mais importantes, pois são responsáveis por mais de 80% das infecções em humanos no mundo. Na Europa, *S. Enteritidis* esteve envolvida em mais de 60% dos casos de salmonelose em humanos (MALORNY et al., 2009). Em contraste com a maioria dos outros sorovares de *Salmonella*, *S. Typhi* é uma bactéria capsulada e patogênica restrita ao homem, causando infecções sistêmicas graves (febre tifóide) e infecções crônicas (portadores assintomáticos).

A gastroenterite por *Salmonella* spp. passou a ser a principal doença transmitida por alimentos a partir de 1995 no Paraná. Dos alimentos associados aos surtos que ocorreram nesse Estado entre 1999 e 2008, 45,0% foram alimentos à base de ovos, 34,8% carnes e derivados e 20,2% classificados como alimentos variados, tais como queijos, saladas, arroz cozido, extrato de tomate, fritas, mandioca, mousse, pudim, sorvetes, farofas, pavês e massas prontas (KOTTWITZ et al., 2010).

*Escherichia coli* pertence ao grupo dos coliformes. Os coliformes totais constituem um grupo de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 a 48 horas a 35 °C. O grupo de coliformes termotolerantes tem a mesma definição dos coliformes totais, porém são capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 a 48 horas a 45 °C. *E. coli* e alguns isolados de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais. A presença dos coliformes termotolerantes nos alimentos não indica necessariamente contaminação fecal, sendo a enumeração da *E. coli* o melhor indicador conhecido (FRANCO e LANDGRAFF, 2004; SILVA et al., 2006).

*E. coli* é um importante componente da microbiota intestinal de humanos. Enquanto algumas cepas colonizam o trato intestinal, outras têm a capacidade de causar doenças intestinais, e são chamadas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC). Segundo Croxen e pesquisadores (2013), são conhecidos sete patotipos de DEC: *E. coli* Enteropatogênica típica e atípica (EPECt e EPECa); *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Produtora de toxina Shiga (STEC), que inclui o subgrupo Enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de Aderência Difusa (DAEC) e *E. coli* Aderente Invasiva (AIEC) (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A classificação destes patotipos consiste na identificação de genes de virulência. Os principais genes utilizados na caracterização genética destes grupos são *stx1* e *stx2* (STEC), *stx1*, *stx2* e *eae* (EHEC), *eae* (EPECa), *eae* e *bfp* (EPECt), genes codificadores de enterotoxinas LT e ST e de fatores de colonização (ETEC), *ipaH* e *ial* (EIEC) e *aggR*, *aap* e *AA probe* (EAEC) (CROXEN et al., 2013). Os genes para a identificação genética de AIEC ainda não foram caracterizados e para DAEC não há consenso entre os autores (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

*Klebsiella pneumoniae* pertence ao grupo coliforme e é uma bactéria ubíqua, que pode ser encontrada em águas de superfície, no esgoto, no solo, em plantas e em mamíferos (humanos, cavalos, porcos, etc.) (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Espécies do gênero *Klebsiella* também causam a deterioração de alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

*Enterococcus* é um gênero de cocos Gram-positivos anaeróbios

facultativos, que formam cadeias de vários comprimentos; eles são resistentes e versáteis, capazes de sobreviver em condições adversas (incluindo elevadas concentrações de sal) e a uma ampla faixa de temperatura (entre 10 ° C e 45 ° C). A espécie *E. faecalis* é encontrada no intestino humano, enquanto que a espécie *E. faecium* pode ser encontrada no intestino humano e de animais. *Enterococcus* spp. podem ser indicadores de contaminação fecal, principalmente de água. A vantagem de pesquisar *Enterococcus* como indicação de contaminação fecal é que isolados desse gênero morrem mais lentamente que *E. coli*, e portanto reduzem o risco de resultados falso-negativos. *E. faecalis* causa deterioração em produtos lácteos, por sobreviver à pasteurização (FORSYTHE, 2013).

Fatores inerentes ao próprio microrganismo e aos hospedeiros tornaram *Enterococcus* spp. um problema clínico. Os fatores inerentes à essa bactéria incluem a resistência aos antimicrobianos, tais como, clindamicina, cefalosporina e aminoglicosídeos e, à capacidade de adquirir e disseminar genes de resistência, como o “cluster” de genes de resistência a vancomicina. Outro fator importante é a maleabilidade de seu genoma que contribui para a sua adaptação em ambientes inóspitos, como os hospitais, e para a colonização do trato gastrointestinal e de outros tecidos. Além disso, o aumento do número de pessoas hospitalizadas em unidades de terapia intensiva, imunocomprometidas, recebendo múltiplas drogas antimicrobianas e utilizando cateteres favorece a infecção por *Enterococcus* (ARIAS & MURRAY, 2012).

O gênero *Staphylococcus* é composto de cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, que podem se apresentar isolados, aos pares e ou aglomerados. A maioria pode multiplicar-se em meios contendo de 7,5 a 15 % de NaCl (FRANCO; LANDGRAF, 2004). Embora encontrado com relativa frequência como membro da microbiota normal do corpo humano, *S. aureus* é causa frequente de infecção, que podem ser localizadas e superficiais ou disseminadas e graves. Além disso, espécies do gênero *Staphylococcus* têm importância clínica devido às infecções hospitalares causadas por isolados multiresistentes (TRABULSI, TEIXEIRA, & BUERIS, 2005).

Isolados enterotoxigênicos de *Staphylococcus* spp, principalmente da espécie *S. aureus* podem causar intoxicação alimentar. As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixa massa molecular, as quais são diferenciadas em vários tipos antigênicos (FORSYTHE, 2013). As enterotoxinas

estafilocócicas são designadas SE, pois induzem a resposta emética após administração oral. As enterotoxinas, estafilocócicas atualmente identificadas são: SEA, SEB, SEC, SED, SEE (denominadas de clássicas), SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET. Toxinas semelhantes, porém sem atividade emética ou sem elucidação deste efeito, são designadas *SE-like* (SE $\ell$ ). Até o momento foram identificadas as toxinas estafilocócicas SE $\ell$ J, SE $\ell$ K, SE $\ell$ L, SE $\ell$ M, SE $\ell$ N, SE $\ell$ O, SE $\ell$ P, SE $\ell$ Q, SE $\ell$ U, SE $\ell$ U2 e SE $\ell$ V. A toxina estafilocócica do choque tóxico (TSST-1), inicialmente designada como SEF, não apresenta atividade emética (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

A ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos alimentos é a causa da intoxicação alimentar estafilocócica. É decorrente da ingestão das toxinas pré-formadas no alimento contaminado. Os alimentos que são contaminados com maior frequência são as carnes cruas e processadas, produtos de ovos, peixe ou massa prontos para consumo, leite e derivados e produtos de confeitaria (FORSYTHE, 2013; SONG et al., 2015). A contaminação é geralmente proveniente dos indivíduos que manipulam os alimentos porque o vestíbulo nasal humano é o principal reservatório de *S. aureus*. Os sintomas consistem de náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais. Geralmente tem início 4 a 6 horas após a ingestão e duram em média 12 horas. A cocção dos alimentos não inativa as enterotoxinas devido à sua termoestabilidade (TRABULSI, TEIXEIRA, & BUERIS, 2005).

### **3.7 Adesão microbiana à superfície dos alimentos**

A adesão bacteriana é um problema para a segurança de alimentos e um desafio para a cadeia produtiva. Alguns vegetais têm características de superfície que corroboram para uma forte adesão e colonização microbiana (FERNANDES et al., 2014). A adesão depende de fatores físico-químicos inerentes à superfície celular e à superfície a ser aderida. Forças de atração e repulsão estão envolvidas e incluem as forças de van der Waals, ligações eletrostáticas, ligações iônicas e interações hidrofóbicas. Quando as forças atrativas superam as forças repulsivas, inicia-se a adesão irreversível. Este processo envolve ligações de hidrogênio e ligações covalentes. Estes mecanismos também estão relacionados à formação de biofilmes (ARAÚJO et al., 2010).

As propriedades físicas e químicas das bactérias e da superfície dos alimentos podem contribuir para a adesão dos microrganismos. Tais propriedades incluem hidrofobicidade, carga elétrica e rugosidade (ARAÚJO et al., 2010; FERNANDES et al., 2014). A hidrofobicidade pode ser a principal força motriz para a adesão da maioria dos patógenos. Geralmente aderem em maior número a superfícies hidrofóbicas. No entanto, é sabido que a bactéria pode alterar a composição da superfície celular em resposta a estímulos ambientais. Desta forma, a hidrofobicidade da célula não é necessariamente constante, e portanto, não é sempre possível prever a tendência de adesão apenas pelo parâmetro de hidrofobicidade (ARAÚJO et al., 2010; DOYLE, 2000).

Dentre as características da superfície dos vegetais, as folhas podem estar recobertas por uma cera, que não só influencia a capacidade de hidratação da superfície, como também pode alterar a interação entre a planta e o microrganismo (FERNANDES et al., 2014).

Em solução, sabe-se que o processo de aderência é termodinamicamente favorável entre superfícies hidrofóbicas como resultado de interações hidrofóbicas que eliminam a camada de água entre as duas superfícies. Quando uma das superfícies é hidrofílica, moléculas na camada de água interagem com essa superfície, reduzindo o fenômeno de adesão. A ausência de uma camada de água é típica das superfícies das folhas de alface, mas a aderência pode ocorrer entre superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas ou entre duas superfícies hidrofílicas (LIMA et al., 2013).

Lima e pesquisadores (2013) observaram que *S. Enteritidis* tem características de superfície hidrofílica e apresentou aderência quatro vezes maior às folhas de alface produzidas no sistema hidropônico (caráter mais hidrofóbico) quando comparado às folhas de alface cultivadas no sistema convencional (mais hidrofílico). Este resultado corrobora com a teoria termodinâmica, e os autores afirmam que é possível estabelecer uma relação entre o número de células aderidas e a hidrofobicidade da superfície. No entanto, o processo de aderência bacteriana é complexo, envolve vários fatores e a hidrofobicidade é apenas um deles.

A carga elétrica da superfície bacteriana e do substrato também influencia no processo de adesão. As bactérias adquirem carga elétrica devido à ionização de grupos existentes em sua superfície, como os grupamentos fosforil, carboxil e amina. As bactérias geralmente são carregadas negativamente. Desde

que a superfície celular encontra-se em contato direto com o ambiente, interações entre os íons ou moléculas carregadas presentes no meio externo podem ocorrer. A correlação entre a carga da superfície e a adesão não é simples, devido à heterogeneidade da composição da superfície celular (ARAÚJO et al., 2010).

A topografia também é um fator relevante na adesão bacteriana. A rugosidade da superfície é tipicamente considerada como a possível causa das discrepâncias entre as previsões teóricas e as observações experimentais da superfície bacteriana. A hipótese mais aceita é que a bactéria se fixa a superfícies mais rugosas devido à maior superfície de contato disponível para a adesão e à proteção contra as forças de cisalhamento. Devido à alta incidência de surtos de origem alimentar que ocorre em todo o mundo, o controle do processo de adesão bacteriana a superfícies de processamento de alimentos é necessário e importante (ARAÚJO et al., 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Determinação da acidez total

Para a determinação da acidez total dos vinagres estudados, do ácido acético (Anidrol®, Brasil) e do ácido láctico (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) concentrados, alíquotas de 2 mL de cada produto foram transferidas para Erlenmeyers contendo 30 mL de água destilada. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L, padronizada, em presença de solução de fenolftaleína. A fórmula matemática  $(V_o \times M \times f \times MM / V \times 10 \times n)$  fornece a concentração de ácido acético presente na amostra, em g por 100 mL, sendo que  $V_o$  é o volume gasto de NaOH em mL;  $M$  é a molaridade da solução de NaOH;  $f$  é o fator de correção da solução de NaOH;  $MM$  é a massa molecular do ácido acético;  $V$  é o volume da amostra em mL e  $n$  é o número de hidrogênios ionizáveis do ácido acético (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### 4.2 Determinação da acidez volátil e fixa dos vinagres estudados

A acidez volátil é expressa em g de ácido acético por 100 mL e é determinada volumetricamente, após a destilação da amostra por arraste a vapor. Alíquotas de 10 mL da amostra foram transferidas para um aparelho gerador de vapor. Após a destilação, recolheu-se 100 mL de destilado em um frasco Erlenmeyer. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de fenolftaleína e procedeu-se a titulação com solução de NaOH 1,0 mol/L padronizada. A fórmula matemática apresentada no item anterior foi utilizada para a determinação da concentração de ácido acético, g por 100 mL. A acidez fixa foi determinada no resíduo após evaporação da amostra, e por titulação com solução de NaOH, pode ser expressa em gramas de ácido acético por 100 mL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### 4.3 Cepas bacterianas padrão

As cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella* ser. Enteritidis (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), mantidas em ágar nutriente a

temperatura ambiente, foram semeadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI – Merck®, Alemanha) e incubadas a 37 °C por 24 h. Para cultivo das cepas, as suspensões de *E. coli* e *K. pneumoniae*, *S. Enteritidis*, *S. aureus* e *E. faecalis* foram semeadas em ágar MacConkey (Difco®, Estados Unidos), ágar XLD (Xilose-Lisina Desoxicolato, Himedia®, Índia), ágar Baird-Parker (Himedia®, Índia) e ágar nutriente adicionado de 6,5 % de NaCl (Himedia®, Índia), respectivamente, e incubadas a 37 °C por 24 h.

#### **4.4 Preparo do inóculo bacteriano**

Suspensões de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. Enteritidis*, *S. aureus* e *E. faecalis* foram cultivadas em caldo de infusão cérebro e coração (BHI – Merck®, Alemanha) a 37 °C por 24 h. Em seguida, as cepas foram semeadas em placas de petri contendo ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, procedeu-se a padronização do inóculo com o auxílio da escala nefelométrica de Mc Farland 0,5 para obter uma concentração bacteriana de aproximadamente 8 log UFC/mL. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas (1:10) até se obter inóculo final de 6 log UFC/mL.

#### **4.5 Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima dos ácidos orgânicos**

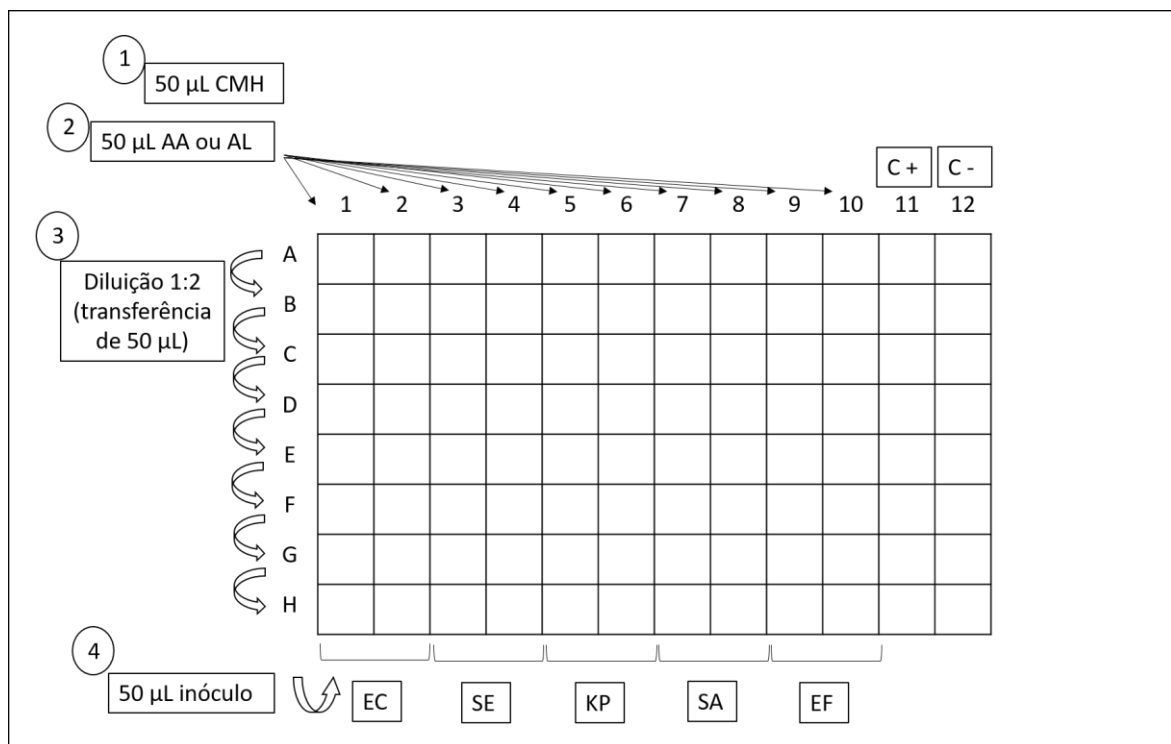
A concentração inibitória mínima (CIM) do ácido acético (AA) e do ácido láctico (AL) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. O AA glacial concentrado (Anidrol®, Brasil) e AL concentrado (Sigma–Aldrich®, Estados Unidos) foram diluídos em caldo Müller-Hinton (CMH) até obtenção de soluções a 4 %.

Alíquotas de 50 µL de CMH foram distribuídos em cada poço da microplaca de 96 poços de fundo chato (passo 1, figura 1). Volumes de 50 µL de solução de AA ou AL foram adicionados aos poços A1 ao A10 (passo 2), em seguida, procedeu-se a diluição 1:2 no sentido vertical (passo 3).

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.4. Alíquotas de 50 µL de cada uma das suspensões bacterianas (6 log UFC/mL) foram adicionadas em duplicata aos poços da microplaca (passo 4), que foi incubada a 37 °C por 24 h.

Como controle positivo foi utilizado 50  $\mu$ L de cada uma das suspensões bacterianas e 50  $\mu$ L de CMH, e como controle negativo foi utilizado 50  $\mu$ L de CMH.

Após o período de incubação, a leitura visual dos poços das microplacas foi realizada. A CIM foi considerada a menor concentração de AA ou AL que não apresentou crescimento, isto é, o poço no qual não foi constatada a turvação do meio. A CBM foi obtida com a semeadura de 10  $\mu$ L de cada poço, utilizado para a determinação da CIM, em placas contendo ágar Müeller-Hinton. Após 24 h de incubação a 37 °C, foi considerada como CBM a menor concentração de AA ou AL que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos testados. O experimento foi realizado em triplicata.



**Figura 1** – Ilustração da microplaca para determinação da concentração bacteriostática e bactericida mínima (passos 1 a 4).

CMH: Caldo Müeller-Hinton; AA: solução ácido acético glacial a 4 %; AL: solução ácido láctico a 4 %; EC: *E. coli*; SE: *S. Enteritidis*; KP: *K. pneumoniae*; SA: *S. aureus*; EF: *E. faecalis*; C+: Controle positivo: 50  $\mu$ L de CMH e 50  $\mu$ L do inóculo dos microrganismos (6 log UFC/mL); C-: Controle negativo (apenas 50  $\mu$ L de CMH);

#### 4.6 Determinação da concentração inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínima dos fermentados acéticos

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os fermentados acéticos de maçã e de mel orgânicos foram diluídos em água destilada

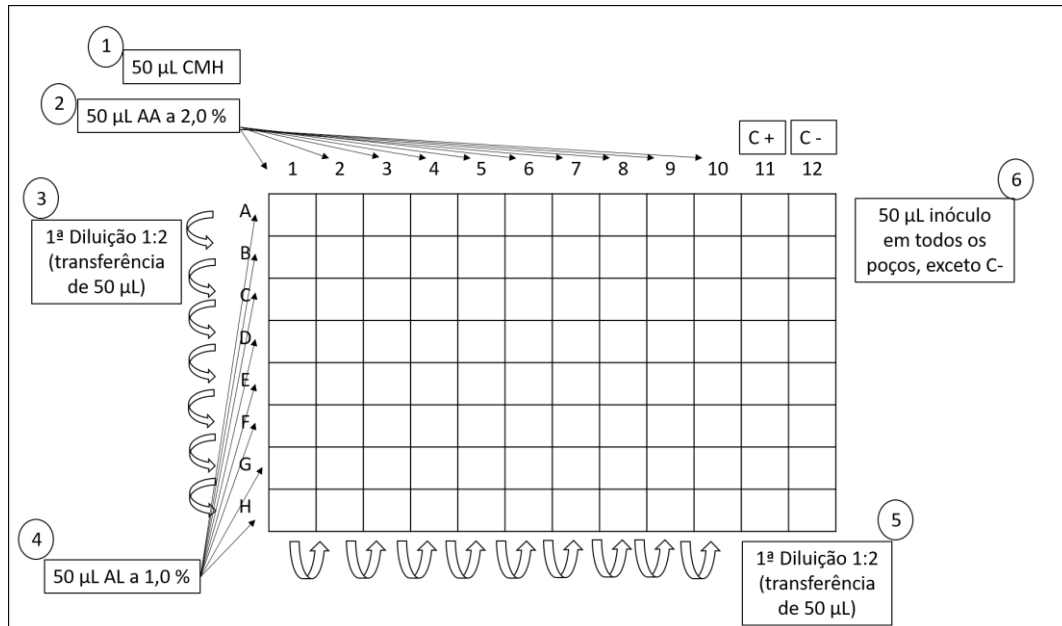
até as concentrações de 2,5; 5,0; 10 e 20 g/L. Em poços distintos de uma microplaca foram adicionados 100 µL de CMH, 50 µL das diferentes soluções dos fermentados acéticos e 50 µL das suspensões bacterianas, preparadas conforme descrito no item 4.4. Em seguida as microplacas foram incubadas a 37 °C. Após 24 h de incubação, a leitura visual das placas foi realizada. A CIM foi considerada a menor concentração do fermentado acético que não apresentou crescimento. A CBM foi obtida com a semeadura de 10 µL de cada poço, utilizado para a determinação da CIM, em placas contendo ágar Müller-Hinton. Após 24 h de incubação, foi considerada como CBM a menor concentração do fermentado acético que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos testados.

#### **4.7 Ensaio *checkerboard***

O método *checkerboard* foi realizado para avaliar o efeito antimicrobiano da combinação entre os ácidos acético e láctico em relação às cepas padrão de *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *S. Enteritidis* (ATCC 13076), *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. faecalis* (ATCC 29212).

O ácido acético e ácido láctico concentrados foram diluídos em CMH até obtenção de solução a 2,0 e 1,0 %, respectivamente. Em seguida, 50 µL de CMH foram distribuídos em cada poço da microplaca de 96 poços de fundo chato (passo 1, figura 2). Alíquotas de 50 µL de solução de AA foram adicionados aos poços A1 ao A8 (passo 2), e em seguida procedeu-se a diluição 1:2 no sentido vertical (passo 3). O volume de 50 µL de solução de AL foram adicionados aos poços 1A ao 1H (passo 4), e a diluição 1:2 foi feita no sentido horizontal (passo 5).

O inóculo dos diferentes microrganismos testados foi preparado conforme item 4.4. Alíquotas de 50 µL das diferentes suspensões bacterianas (6 log UFC/mL) foram adicionadas a todos os poços da microplaca (passo 6), que foi incubada a 37 °C por 24 h. Cada microplaca foi destinada à avaliação de um único microrganismo. Como controle positivo foi utilizado 50 µL de CMH e 50 µL das suspensões bacterianas, e como controle negativo foi utilizado apenas 50 µL de CMH. O experimento foi realizado em triplicata para cada microrganismo testado.



**Figura 2** – Ilustração da microplaca para o ensaio *checkerboard*.

CMH: Caldo Müeller-Hinton; AA: solução ácido acético glacial a 2,0 %; AL: solução ácido láctico a 1,0 %; ; C+: Controle positivo: 50 µL de CMH e 50 µL do inóculo dos microrganismos (6 log UFC/mL); C-: Controle negativo (apenas 50 µL de CMH);

O poço da microplaca em que não houve crescimento bacteriano foi considerado a combinação de ácido acético e láctico a qual inibiu o desenvolvimento microbiano. Desta forma, foi determinada a concentração inibitória fracionada (CIF), que foi calculada segundo a equação:  $CIF = CIFA + CIFB = [A]/CIMA + [B]/CIMB$ , sendo que A = concentração inibitória mínima (CIM) do ácido acético na combinação; CIMA= CIM do AA sozinho; B = CIM do ácido láctico (AL) na combinação; CIMB = CIM do AL sozinho. Se  $CIF \leq 0,5$ , foi considerado como efeito de sinergismo;  $0,5 \leq CIF \leq 1$ , aditismo; e  $CIF > 1$ , indiferente (CHIN; WEITZMAN, 1997; NISHIO et al., 2016).

## 4.8 Avaliação da eficiência das soluções de vinagres de maçã e mel orgânicos e da água sanitária na desinfecção de diferentes alimentos naturalmente contaminados

### 4.8.1 Preparação das amostras de alimentos

Amostras de alface crespa (*Lactuca sativa*) cultivadas pelo sistema hidropônico, salsinha (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*), tomate tipo cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) e pepino tipo japonês (*Cucumis sativus*)

foram comprados em supermercados locais. As folhas de alface foram cortadas transversalmente (4 cm de largura) com auxílio de facas esterilizadas. Os talos da salsinha foram desprezados. Os pepinos tipo japonês foram descascados, e as partes interiores do legume foram desprezadas. Em seguida, alíquotas de 10 g de alface, 10 g de salsinha, 25 g de tomates tipo cereja íntegros e 25 g das cascas do pepino tipo japonês foram separadamente acondicionadas em sacos estéreis.

#### 4.8.2 Preparo das soluções desinfetantes

Os vinagres de maçã e de mel orgânicos foram fornecidos pela indústria Dom Spinosa®, Assis – SP. Estes produtos não passaram pelo processo de diluição realizado pelas indústrias, portanto apresentavam maior acidez que os vinagres comerciais. As concentrações de ácido acético nos vinagres foram determinadas pela técnica de titulação da acidez total, determinação da acidez volátil e acidez fixa, segundo o manual Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A acidez volátil, a acidez fixa e a acidez total dos vinagres avaliados estão na tabela 2. Essas concentrações foram utilizadas para o preparo das soluções desinfetantes.

**Tabela 2** - Acidez volátil, fixa e total dos vinagres utilizados para a preparação das soluções desinfetantes

Vinagres*	Acidez volátil	Acidez fixa	Acidez total
Vinagre de maçã orgânico	69,0 g/L	4,0 g/L	73,0 g/L
Vinagre de mel orgânico	67,0 g/L	7,0 g/L	74,0 g/L

\* Vinagres orgânicos produzidos por Dom Spinosa®, Assis, SP

Soluções de vinagre foram preparadas pela diluição em água destilada na proporção de 23 % (v/v) para se obter soluções com aproximadamente 15 g/L de ácido acético.

A solução de hipoclorito de sódio foi preparada a partir da água sanitária (Qboa®), e titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N (conforme item 4.8.3), para determinação da concentração de cloro livre (AOAC, 2012). A

concentração final da solução de hipoclorito de sódio utilizada para a desinfecção dos alimentos foi de 0,2 g/L.

A água destilada esterilizada também foi utilizada para a realização de um ensaio controle, para verificar o efeito do enxágue na redução da população microbiana.

#### 4.8.3 Titulação da solução de hipoclorito de sódio

##### 4.8.3.1 Padronização da solução de tiosulfato 0,1 N

Uma porção de 24,82 g de tiosulfato pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) foi pesado e transferido para um balão volumétrico de capacidade de 1 L e avolumado com água destilada fervida.

O padrão primário dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), inicialmente, foi seco em estufa a 100 °C por 2 h, e resfriado em dessecador. Alíquotas de 0,2 a 0,23 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  foi pesado e dissolvido em 80 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 2,0 g de iodeto de potássio (KI) e 8,0 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Após homogeneização, foi titulado com a solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  até a observação da mudança da cor marrom para amarelo-esverdeado. Volume de 1,0 mL de solução de amido a 1,0 % foi adicionada e a titulação continuada até que a cor azul se tornasse verde-clara. O volume de solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  utilizado foi registrado, e aplicado na seguinte equação:  $N_{\text{Na}_2\text{SO}_3} = \frac{\text{g}(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) \cdot 1000}{\text{mL}(\text{Na}_2\text{SO}_3) \cdot 49.032}$ . Este procedimento foi realizado em triplicata (AOAC, 2012).

##### 4.8.3.2 Determinação da concentração de cloro residual livre

Primeiramente, foi preparada uma solução de hipoclorito de sódio, pela adição 12,5 mL de água sanitária (Q-boa®) balão volumétrico de 250 mL, avolumado com água destilada.

Em um Erlenmeyer foram adicionados 30 mL de água destilada, 10 mL de solução de KI a 10 %, 10 mL da solução de hipoclorito de sódio, e 5,0 mL de ácido acético glacial concentrado. Em seguida, esta mistura foi titulada com a solução de tiosulfato de sódio padronizada até o aparecimento da cor amarela

pálida. Neste momento, foi adicionado 1 mL de solução de amido a 1,0 %, e a titulação continuada até que a solução se tornasse incolor. A quantidade de solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Vg) utilizada foi aplicada na seguinte equação:  $[\text{NaOCl}] = \text{Vg} (\text{SO}_3) \cdot 3,72 \cdot 20$ , sendo que o fator 3,72 refere-se a estequiometria da reação e o valor 20, à diluição da amostra. Este procedimento foi realizado em triplicata e o resultado expresso em g/L (AOAC, 2012).

#### 4.8.4 Descontaminação dos vegetais

Alíquotas de 100 mL das soluções desinfetantes, preparadas conforme o item 4.8.2, foram adicionadas aos sacos estéreis contendo as amostras dos alimentos, e deixadas por 15 min a temperatura ambiente. Após este período, as soluções foram removidas dos recipientes, e em seguida foi adicionado 225 mL de água peptonada tamponada (APT) 0,1 %. Imediatamente iniciou-se a contagem dos microrganismos sobreviventes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.8.5 Contagem total dos aeróbios mesófilos (AM)

As porções de alimentos preparados e desinfetados, conforme os itens 4.8.1 e 4.8.2, foram transferidas assepticamente para sacos plásticos estéreis contendo respectivamente, 90 mL e 225 mL de APT 0,1 %. A homogeneização foi realizada por agitação manual durante 30 s. Diluições decimais foram realizadas e, para a contagem total de AM, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em duplicata em ágar BHI (Himedia®, Índia). Após 48 horas de incubação a 37 °C, foi realizada a contagem das colônias.

A contagem total de AM foi realizada com as porções dos vegetais antes e após a descontaminação com as soluções desinfetantes, para determinar o número de bactérias presentes naturalmente nas amostras e o número dos que sobreviveram à descontaminação.

#### 4.8.6 Análise estatística

A avaliação dos efeitos dos tratamentos foi realizada por meio do cálculo da redução da carga microbiana existente no alimento fresco, expressa pela equação  $\log(N/N_0)$  (RAMOS et al., 2014). Sendo  $N_0$  a contagem de bactérias presentes no alimento antes do procedimento de desinfecção e  $N$  é a contagem das bactérias que sobreviveram no alimento após a desinfecção. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a influência das soluções desinfetantes na inativação dos microrganismos pelo teste Tukey post-hoc utilizando o software Statistica. O nível de significância para todos os testes foi de 0,05 ( $P < 0,05$ ).

#### 4.8.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Fragmentos de 5 mm de diâmetro de cada amostra de alimento foram coletadas antes e após os procedimentos de desinfecção. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de 2,5 % de glutaraldeído, 2,0 % paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol/L (pH 7.2) por 24h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série etanólica (30, 50, 70, 90 e 100 %), secas ao ponto crítico (BALTEC CPD 030, *Critical Point Dryer*, Alemanha), montadas em suportes de alumínio com fita de carbono e pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, *Sputter Coater*, Alemanha). As amostras foram observadas no equipamento FEI Quanta 200 (FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de  $10^6$  torr. As eletromicrografias foram geradas em modo topográficos (elétrons secundários) a 25 kV e distância de trabalho de 10mm.

### **4.9 Determinação da atividade bactericida das soluções a base de ácidos orgânicos e vinagres em relação às cepas de *E. coli* e *E. faecalis*, segundo AOAC 965.13**

#### 4.9.1 Preparo das diferentes soluções desinfetantes

Neste ensaio foram testadas seis diferentes soluções desinfetantes à base de ácidos orgânicos, denominadas A, B, C, D, E, F e G, e uma solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L, denominada H, como mostra a tabela 3.

**Tabela 3**– Soluções desinfetantes e os valores de pH

<b>Soluções</b>	<b>Componentes</b>	<b>pH*</b>
<b>A</b>	Ácido láctico (15 g/L)	2,4 ± 0,05 <sup>e</sup>
<b>B</b>	Ácido acético glacial (15 g/L)	2,5 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>C</b>	Ácido acético glacial (15 g/L) + ácido láctico (10 g/L)	2,2 ± 0,01 <sup>f</sup>
<b>D</b>	Ácido acético glacial (15 g/L) + ácido láctico (15 g/L)	2,1 ± 0,01 <sup>d</sup>
<b>E</b>	Vinagre de maçã orgânico (15 g/L ácido acético)	3,0 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>F</b>	Vinagre de maçã orgânico (15 g/L ácido acético) + ácido láctico (10 g/L)	2,3 ± 0,01 <sup>e</sup>
<b>G</b>	Vinagre de maçã orgânico (15 g/L ácido acético) + ácido láctico (15 g/L)	2,2 ± 0,01 <sup>f</sup>
<b>H</b>	Hipoclorito de sódio (0,2 g/L)	9,0 ± 0,02 <sup>a</sup>

\* Média das triplicatas ± desvio padrão. <sup>a-f</sup> Valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

A solução A foi preparada a partir do ácido láctico concentrado (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) que foi diluído em água destilada até a concentração de 15 g/L. A solução B foi obtida pela diluição do ácido acético glacial (Anidrol®, Brasil) concentrado em água destilada até a concentração de 15 g/L. As soluções C e D foram preparadas da mesma maneira que a solução A, no entanto foram acrescentadas alíquotas de solução de ácido láctico até a obtenção da concentração final de 10 e 15 g/L, respectivamente (tabela 3).

A solução E foi preparada a partir do vinagre de maçã orgânica (Dom Spinosa®) que apresentava acidez volátil de 69 g/L e foi diluído em água destilada até a concentração de 15 g/L. As soluções F e G foram preparadas, inicialmente, da mesma forma que a solução D, porém foram adicionadas alíquotas de solução de ácido láctico para obtenção da concentração de 10 e 15 g/L, respectivamente.

A solução H foi preparada a partir da água sanitária comercial (Qboa®). A concentração de hipoclorito de sódio (NaOCl) do produto foi determinada pela titulação com tiosulfato de sódio, descrito no item 4.9.3. A água sanitária foi diluída para se obter uma solução de NaOCl na concentração de 0,2 g/L.

O pH das soluções foi determinado em pHmetro (Kasvi®, Brasil) e as médias dos valores de pH estão dispostas na tabela 3.

#### 4.9.3 Determinação da atividade bactericida das diferentes soluções desinfetantes

A atividade bactericida das soluções desinfetantes foi determinada pela metodologia preconizada pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para desinfetantes para água de piscina com modificações (AOAC, 2012).

As suspensões de *E. coli* (ATCC 25922) e de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram utilizados para a determinação da atividade bactericida das soluções desinfetantes. As suspensões foram preparadas com o auxílio da escala nefelométrica de McFarland 0,5 para a obtenção de aproximadamente 8 log UFC/mL.

As soluções desinfetantes testadas e as suspensões bacterianas de *E. coli* e *E. faecalis* utilizadas foram preparadas conforme item 4.9.1, respectivamente. Dois frascos contendo 199 mL de cada solução desinfetante foram preparados. Ao primeiro frasco, foi adicionado 1,0 mL da suspensão de *E. coli* e, ao segundo frasco foi acrescentado 1,0 mL da suspensão de *E. faecalis*. Após os intervalos de 0,5; 1, 2, 3, 4, 5 e 10 min, alíquotas de 1,0 mL, em cada intervalo de tempo, foram transferidas para tubos contendo 9 mL de soluções neutralizadoras. Após vigorosa agitação, alíquotas de 1,0 mL foram inoculadas em 5 tubos contendo 9,0 mL de caldo BHI (Merck®, Alemanha) e 0,1 mL em placas contendo ágar BHI (Merck®, Alemanha), que foram incubados a 37 °C por 24 h. A ausência de crescimento bacteriano nas placas e nos 5 tubos indicou o intervalo de tempo necessário para a completa eliminação dos microrganismos testados. Os experimentos foram realizados em triplicata. As soluções neutralizadoras utilizadas foram tampão difosfato 0,1 mol/L (Cinética®, Brasil) para neutralizar as soluções de ácidos orgânicos, e tiosulfato de sódio 0,1 % (Sigma®, Estados Unidos) para neutralizar a solução de cloro.

### **4.10 Avaliação da eficiência das soluções desinfetantes em amostras de alimentos artificialmente contaminados**

#### 4.10.1 Preparação das amostras de alimentos

Amostras de alface crespa (*Lactuca sativa*) cultivadas pelo sistema hidropônico, salsinha (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*), tomate tipo cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) e pepino tipo japonês (*Cucumis sativus*) foram comprados em supermercados da cidade de Londrina, PR. As folhas de alface foram cortadas transversalmente (4 cm de largura) com auxílio de facas esterilizadas. Os talos da salsinha foram desprezados. Os pepinos tipo japonês foram descascados, e as partes interiores do legume foram desprezadas.

Dez porções de cada alimento (10 g de alface, 10 g de salsinha, 25 g de tomates tipo cereja íntegros; e 25 g das cascas do pepino japonês) foram acondicionadas em diferentes sacos plásticos estéreis. Assim, 40 amostras foram preparadas e analisadas em cada replicata.

#### 4.10.2 Contaminação das amostras de alimentos

Cinco amostras de cada alimento foram contaminadas com 100 mL da suspensão de *E. coli*, e as outras cinco amostras foram contaminadas com 100 mL da suspensão de *E. faecalis*, preparadas conforme item 4.9.3, porém submetidas a diluição 1:10 em APT a 0,1 % para a obtenção de uma contagem bacteriana de aproximadamente 7 log UFC/mL. As suspensões bacterianas foram mantidas em contato com as amostras dos alimentos por 30 min, em seguida as suspensões foram removidas dos sacos plásticos. As amostras foram armazenadas a 5 °C por 24 h para permitir a adesão das bactérias aos alimentos.

#### 4.10.3 Desinfecção dos alimentos e enumeração de *E. coli* e *E. faecalis*

Para a desinfecção, 100 mL das soluções C, F, H, ou de água esterilizada (ensaio controle) foram adicionadas a cada amostra de alimento contaminada com *E. coli* ou *E. faecalis*. Após imersão por 15 min a 25 °C, as soluções foram removidas. Em seguida, 90 mL de APT 0,1 % foram adicionados as amostras de alface e salsinha, e 225 mL de APT 0,1 % foram adicionados as amostras de tomate cereja e pepino japonês. Após homogeneização por agitação manual durante 30 s, diluições seriadas de cada amostra foram preparadas utilizando APT 0,1 %, e 0,1 mL de cada diluição foram semeados em ágar eosina

azul de metileno (EMB, Himedia®, Índia) e ágar BHI (Merck®, Alemanha) para a contagem das colônias de *E. coli* e *E. faecalis*, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e as colônias foram contadas. O experimento foi realizado em triplicata.

Uma amostra de cada vegetal não foi descontaminado. A contagem bacteriana nestas amostras foi considerada o número de bactérias que aderiram aos alimentos (No).

#### 4.10.4 Análise estatística

A avaliação dos efeitos dos tratamentos foi realizada por meio do cálculo da redução da carga microbiana existente no alimento fresco, expressa pela equação  $\log(N/N_0)$ . Sendo  $N_0$ , a contagem de microrganismos presente no alimento antes do procedimento de desinfecção, e  $N$ , a contagem dos microrganismos após a desinfecção do alimento (RAMOS et al., 2014). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a influência das soluções desinfetantes na inativação dos microrganismos pelo teste Tukey post-hoc por meio do software Statistica. O nível de significância para todos os testes foi de 0,05 ( $P < 0,05$ ).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados nos artigos I, II e anexos A e B, que serão publicados em revistas científicas:

Artigo I - Eficácia dos vinagres de maçã e mel orgânicos na redução da contaminação microbiana natural de vegetais.

Artigo II - Comparison of the efficiency of chlorine and organic acid solutions in reducing *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in food.

Anexo A - Resultados da determinação da concentração inibitória e bactericida mínima dos ácidos orgânicos e fermentados acéticos.

Anexo B - Resultados da determinação da concentração inibitória e bactericida mínima dos fermentados acéticos estudados.

## **Artigo I - Eficácia dos vinagres de maçã e mel orgânicos na redução da contaminação microbiana natural de vegetais**

Natália Harumi Niguma, Wilma Aparecida Spinosa, Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior, Tereza Cristina R. M de Oliveira

### **RESUMO**

A desinfecção é a etapa crítica para a redução do número de microrganismos patogênicos e deteriorantes na cadeia produtiva de hortifrutícolas. O cloro e seus derivados são muito utilizados para esta finalidade, porém estudos mostram que essas substâncias têm efeito deletério para a qualidade sensorial dos alimentos, podem perder a atividade pela reação com a matéria orgânica e, formam subprodutos nocivos à saúde humana. No momento, existe a tendência de se substituir o uso do cloro na desinfecção dos alimentos. Vários estudos mostraram resultados favoráveis à aplicação do ácido acético e do vinagre para o controle da contaminação microbiana em vegetais frescos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de soluções de vinagres de maçã e mel orgânicos, e hipoclorito de sódio na redução da contaminação natural presente em diferentes alimentos. Amostras de alface crespa, salsinha, tomate cereja e pepino japonês foram desinfetados com soluções de vinagre de maçã e de mel orgânicos a 23 % (v/v) com concentração de aproximadamente 15 g/L de ácido acético e solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L. O ensaio controle foi realizado com água destilada esterilizada para verificar o efeito do enxágue na redução da contaminação. Para a avaliação do efeito das soluções desinfetantes foi realizada a contagem total de aeróbios mesófilos (AM) antes e após a descontaminação dos alimentos. As soluções de vinagres de maçã e de mel orgânicos foram eficazes na remoção da contaminação presente naturalmente nos alimentos. Ambos os tratamentos e a solução de hipoclorito de sódio (0,2 g/L) alcançaram reduções, em média de 2 ciclos log, na contagem total de AM em amostras de tomate cereja e salsinha. Para as amostras de alfaces as soluções de vinagres tiveram resultados superiores aos obtidos com hipoclorito de sódio. Já as amostras de pepino japonês foram as mais difíceis de desinfetar, e todos os tratamentos de desinfecção testados foram semelhantes ao enxágue com água. Os resultados mostraram que a escolha do método de desinfecção deve ser criteriosamente avaliada. Procedimentos eficazes para um tipo de alimento podem não ser para outro tipo de alimento, uma vez que, as características da superfície dos vegetais têm importante influência para a atividade dos desinfetantes.

**Palavras-chave:** aeróbios mesófilos; desinfecção; microscopia eletrônica de varredura; hipoclorito de sódio; hortifrutícolas

### **1. INTRODUÇÃO**

O consumo de frutas, legumes e verduras frescos é essencial para uma dieta saudável. A ingestão desses produtos é recomendada pelos órgãos de saúde para a manutenção da saúde, o que levou ao aumento do consumo destes alimentos nos últimos anos. No entanto, esta mudança elevou a frequência de surtos

de doenças associadas ao consumo de frutas, legumes e verduras crus (PARK et al., 2013; PRADO-SILVA et al., 2015).

Os vegetais podem ser contaminados por microrganismos patogênicos ainda no campo ou durante a colheita, transporte, processamento, distribuição, comercialização e manipulação pelo consumidor (INATSU et al., 2017). Os vegetais oferecidos nos serviços de alimentação ou as indústrias de minimamente processados são frequentemente a origem de doenças. Esses alimentos são prontos para o consumo e os processos de desinfecção podem não ser suficientemente eficazes para a redução da contaminação microbiana (MACHADO et al., 2017).

A desinfecção é a etapa crítica no pós-colheita para a redução do número de microrganismos. Durante este processo, os alimentos entram em contato com os desinfetantes adicionados em tanques de lavagem (BENCARDINO; VITALI; PETRELLI, 2018; PRADO-SILVA et al., 2015). A desinfecção com agentes químicos deve ser eficiente para a inativação dos microrganismos patogênicos e deteriorantes (MACHADO et al., 2017; POIMENIDOU et al., 2016), porém essas substâncias, geralmente, não eliminam totalmente os microrganismos. Na maioria dos estudos já realizados observa-se uma redução da contaminação em até 2 ciclos log (SREY; JAHID; HA, 2013).

Estratégias de controle microbiano eficientes para erradicar completamente os microrganismos patogênicos presentes em vegetais crus, sem afetar a qualidade sensorial desses alimentos, ainda não estão disponíveis (SREY; JAHID; HA, 2013). A obtenção de produtos hortifrutícolas seguros, principalmente os minimamente processados e prontos para consumo, e a manutenção do frescor destes produtos, são um enorme desafio para a cadeia produtiva desses alimentos (PRADO-SILVA et al., 2015).

O cloro e seus derivados são comumente utilizados como desinfetantes, tais como hipocloritos, compostos clorados orgânicos e inorgânicos. Apresentam amplo espectro germicida devido à sua ação sobre a membrana celular, inibição de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, danos no DNA e oxidação de proteínas celulares (MACHADO et al., 2010). Embora seja muito utilizado, estudos mostram que o cloro tem efeito deletério para a qualidade dos alimentos, como odor desagradável (PARISH et al., 2003; RICO et al., 2007). Além disso, o hipoclorito perde sua atividade pela reação com compostos nitrogenados

presentes nos alimentos e detritos e, resultam na formação de subprodutos como trihalometanos, potencialmente nocivos à saúde (INATSU et al., 2017). Portanto, existe a necessidade de se substituir a aplicação do cloro na desinfecção dos alimentos.

A aplicação de ácidos orgânicos para o aumento da segurança ou higiene dos alimentos tem sido uma das alternativas para se evitar o consumo de alimentos tratados com compostos químicos nocivos à saúde (INATSU et al., 2017; SENGUN; KARAPINAR, 2004). Vários estudos mostraram resultados favoráveis à aplicação do ácido acético e do vinagre para o controle de patógenos em vegetais frescos (NASTOU et al., 2012; RAMOS et al., 2014; SENGUN; KARAPINAR, 2004). Os vinagres são produtos de baixo custo e de fácil acesso, que apresentam a vantagem de não serem tóxicos ou gerarem subprodutos com efeito mutagênico como os compostos clorados (BANG et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de soluções de vinagres de maçã e mel orgânicos, e hipoclorito de sódio na redução da contaminação natural presente em amostras de tomate, salsa, alface e pepino.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Preparação das amostras de alimentos**

Alface crespa (*Lactuca sativa*) cultivadas pelo sistema hidropônico, salsa (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*), tomate tipo cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) e pepino tipo japonês (*Cucumis sativus*) foram comprados em supermercados locais. As folhas de alface foram cortadas transversalmente (4 cm de largura) com auxílio de facas esterilizadas. Os talos da salsa foram desprezados. Os pepinos tipo japonês foram descascados, e as partes interiores do legume foram desprezadas. Em seguida, alíquotas de 10 g de alface, 10 g de salsa, 25 g de tomates tipo cereja íntegros e 25 g das cascas do pepino tipo japonês foram separadamente acondicionadas em sacos para *stomacher* estéreis.

### **2.2 Preparo das soluções desinfetantes**

Os vinagres de maçã e de mel orgânicos foram fornecidos pela indústria Dom Spinosa®, Assis – SP. Estes produtos não passaram pelo processo de diluição, realizado industrialmente, portanto apresentavam maior acidez que os vinagres comerciais. As concentrações de ácido acético nos vinagres foram determinadas pela técnica de titulação da acidez total, determinação da acidez volátil e acidez fixa, segundo o manual Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A acidez volátil, a acidez fixa e a acidez total dos vinagres avaliados estão na tabela 1. Essas concentrações foram utilizadas para o preparo das soluções desinfetantes.

**Tabela 1** - Acidez volátil, fixa e total dos vinagres utilizados para a preparação das soluções desinfetantes

Vinagres*	Acidez volátil	Acidez fixa	Acidez total
Vinagre de maçã orgânico	69,0 g/L	4,0 g/L	73,0 g/L
Vinagre de mel orgânico	67,0 g/L	7,0 g/L	74,0 g/L

\* Vinagres orgânicos produzidos por Dom Spinosa®, Assis, SP

Soluções de vinagre foram preparadas pela diluição em água destilada na proporção de 23 % (v/v) para se obter soluções com aproximadamente 15 g/L de ácido acético.

A solução de hipoclorito de sódio foi preparada a partir da água sanitária (Qboa®), e titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N, para determinação da concentração de cloro livre (AOAC, 2012). A concentração final da solução de hipoclorito de sódio utilizada para a desinfecção dos alimentos foi de 0,2 g/L.

A água destilada esterilizada também foi utilizada para a realização de um ensaio controle, para verificar o efeito do enxágue na redução da população microbiana.

### 2.3 Descontaminação dos vegetais

Alíquotas de 100 mL das soluções desinfetantes, preparadas conforme 2.2, foram adicionadas aos sacos estéreis contendo as amostras dos alimentos, e deixadas por 15 min a temperatura ambiente. Após este período, as

soluções foram removidas dos recipientes, e em seguida foi adicionado 225 mL água peptonada tamponada. Imediatamente iniciou-se a contagem dos microrganismos sobreviventes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **2.4 Contagem total dos mesófilos aeróbios**

Porções de 10 g de alface e salsinha; e porções de 25 g de casca de pepino tipo japonês e de tomate tipo cereja íntegros, preparados conforme item 2.1, foram transferidas assepticamente para sacos plásticos estéreis contendo, respectivamente, 90 mL e 225 mL de água peptonada tamponada 0,1 %, respectivamente, em sacos estéreis. A homogeneização foi realizada por agitação manual durante 30 segundos. Diluições decimais foram realizadas e, para a contagem total de AM, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em duplicata em ágar BHI (Himedia®, Índia). Após 48 horas de incubação a 37 °C foi realizada a contagem das colônias.

A contagem total de AM foi realizada com as porções dos vegetais antes e após a descontaminação com as soluções desinfetantes, para determinar o número de bactérias presentes nas amostras e o número dos que sobreviveram à descontaminação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **2.5 Análise estatística**

A avaliação dos efeitos dos tratamentos foi realizada por meio do cálculo da redução da carga microbiana existente no alimento fresco, expressa pela equação  $\log (N/N_0)$  (RAMOS et al., 2014). Sendo  $N_0$  a contagem de bactérias presentes no alimento antes do procedimento de desinfecção e  $N$  é a contagem das bactérias que sobreviveram no alimento após a desinfecção. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a influência das soluções desinfetantes na inativação dos microrganismos pelo teste Tukey post-hoc utilizando o software Statistica. O nível de significância para todos os testes foi de 0,05.

#### **2.6 Microscopia eletrônica de varredura**

Fragmentos de 5 mm de diâmetro de cada amostra de alimento foram coletadas antes e após os procedimentos de desinfecção. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de 2,5 % de glutaraldeído, 2,0 % paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol/L (pH 7.2) por 24h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série etanólica (30, 50, 70, 90 e 100 %), secas ao ponto crítico (BALTEC CPD 030, *Critical Point Dryer*, Alemanha), montadas em suportes de alumínio com fita de carbono e pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, *Sputter Coater*, Alemanha). As amostras foram observadas no equipamento FEI Quanta 200 (FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de  $10^6$  torr. As eletromicrografias foram geradas em modo topográficos (elétrons secundários) a 25 kV e distância de trabalho de 10mm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem total de AM foi escolhida como indicador da eficiência da desinfecção, pois refere-se à contaminação natural presente na superfície dos alimentos. Essa contaminação ocorre durante o desenvolvimento do vegetal, devido ao contato com o solo, a água de irrigação, os adubos, etc (BENCARDINO; VITALI; PETRELLI, 2018; OLIVEIRA et al., 2012). Os microrganismos também podem formar biofilmes na superfície dos vegetais, que aumentam a sua habilidade de sobreviver ao estresse, e constituem um potencial reservatório de patógenos (DI CICCIO et al., 2015).

A legislação brasileira não estabelece limite máximo de contagem para aeróbios mesófilos para vegetais frescos, mas existe um consenso de que a máxima contagem tolerada deve ser entre 5,0 e 6,0 log UFC/g (MACHADO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2012). As amostras de salsinha e alface apresentaram contagens superiores ao limite sugerido, o que evidencia a necessidade da realização dos procedimentos de desinfecção antes do consumo destes alimentos. Vegetais frescos podem conter altas contagens de microrganismos, e o microbioma é tipicamente constituído pelas famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, seguida pelas bactérias lácticas, leveduras e fungos (LIMA et al., 2013).

As contagens totais de AM presentes inicialmente nas amostras ( $N_0$ ) de tomate cereja, salsinha, alface e pepino eram de 5,4; 7,7; 7,0 e 5,4 log UFC/g, respectivamente. A tabela 2 mostra a redução de AM nos alimentos após a imersão

em água e após os diferentes procedimentos de desinfecção. A imersão dos alimentos em água por 15 min. levou a redução de 0,9; 0,9; 0,3 e 0,4 log UFC/g da contagem presente nas amostras de tomate cereja, salsinha, alface e pepino, respectivamente. Alguns estudos já foram realizados para verificar a redução da contaminação microbiana após o enxágue ou imersão de hortaliças em água.

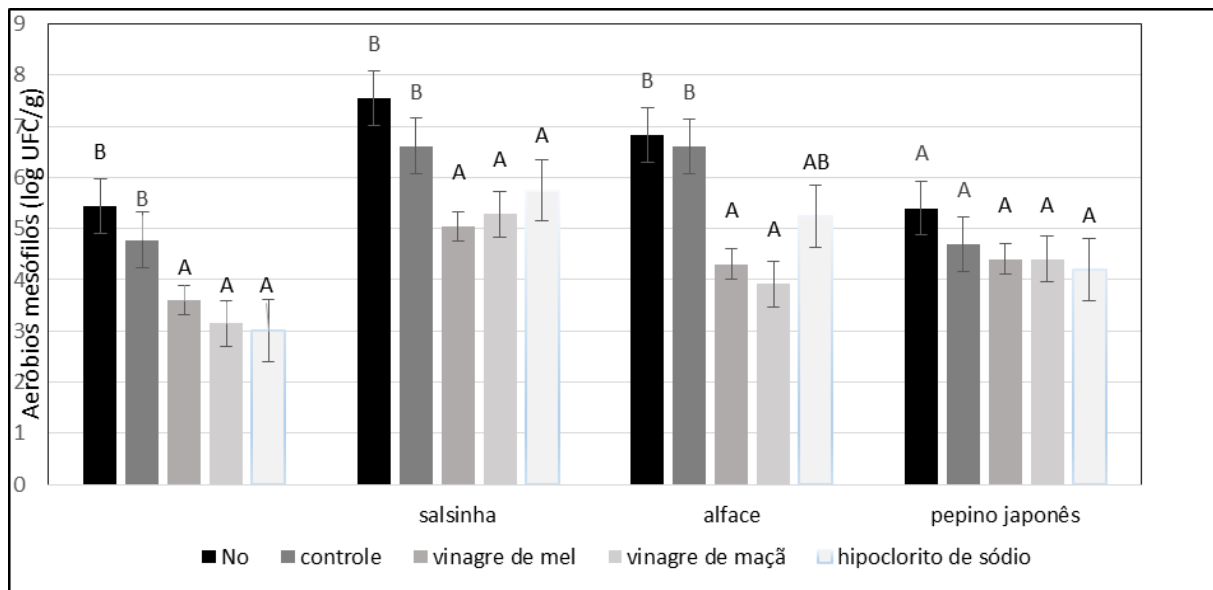
**Tabela 2** - Redução da contagem total de aeróbios mesófilos, em termos de log N/No, após a desinfecção ou imersão em água, em alimentos naturalmente contaminados.

Soluções desinfetantes	Alimentos			
	Tomate cereja	Salsinha	Alface	Pepino japonês
Vinagre de maçã	2,4 ± 0,6 <sup>*A</sup>	2,2 ± 0,6 <sup>A</sup>	2,6 ± 0,7 <sup>A</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>A</sup>
Vinagre de mel	2,0 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,7 ± 0,7 <sup>A</sup>	2,3 ± 0,6 <sup>A</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>A</sup>
Hipoclorito de sódio	2,4 ± 0,6 <sup>A</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>A</sup>	1,5 ± 0,5 <sup>AB</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>A</sup>
Controle	0,9 ± 0,1 <sup>B</sup>	0,9 ± 0,5 <sup>B</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>B</sup>	0,4 ± 0,3 <sup>A</sup>

Vinagre de maçã (23 % v/v); vinagre de mel (23 % v/v); Água sanitária (0,2 g/L hipoclorito de sódio); Controle (imersão em água destilada esterilizada). \*Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ )

Poimenidou e colaboradores (2016) observaram redução de 0,6 e 0,5 log UFC/g na contagem de AM em amostras de espinafre e alface, respectivamente, após imersão em água gelada por 30 s. Nascimento e pesquisadores (2003) observaram redução de 0,8 log UFC/g de AM após enxágue em água corrente por 1 min. Outros autores empregaram maior tempo de imersão em água com reduções na contaminação semelhantes. Machado e colaboradores (2017) obtiveram redução de 0,3 log UFC/g em amostras de tomates após imersão em água por 15 min. Reduções na contagem de AM entre 0,2 e 0,7 log UFC/g em amostras de alfaces foram observados após imersão em água por 30 min. (BENCARDINO; VITALI; PETRELLI, 2018; OLIVEIRA et al., 2012).

Os resultados deste trabalho mostraram que o enxágue em água não é eficiente para a redução da carga microbiana da superfície dos alimentos (figura 1), embora seja a maneira mais comumente utilizada, principalmente a nível doméstico. A não aplicação de desinfetante na higienização de legumes e verduras permite que altos níveis de contaminação permaneçam nos alimentos, inclusive os microrganismos patogênicos.



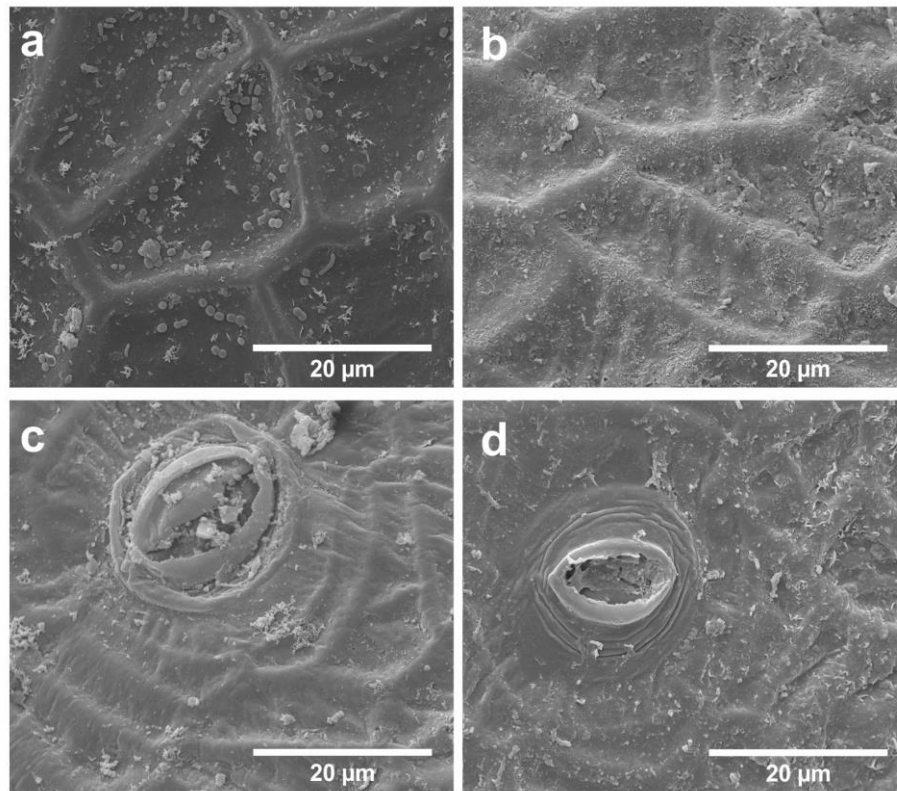
**Figura 1** – Contagem de aeróbios mesófilos em alimentos naturalmente contaminados, após os diferentes procedimentos de desinfecção.

No: Contagem total de aeróbios mesófilos presentes nas amostras de alimentos antes do procedimento de desinfecção. Controle: imersão em água destilada esterilizada; Vinagre de mel (23 % v/v); Vinagre de maçã (23 % v/v); Água sanitária (0,2 g/L hipoclorito de sódio); Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ )

A solução de vinagre de maçã (15 g/L de ácido acético) provocou a redução de 2,4 e 2,2 log UFC/g e, o vinagre de mel (15 g/L) reduziu em 2,0 e 2,7 log UFC/g o número de AM nas amostras de tomate cereja e salsinha, respectivamente (tabela 2). Machado e pesquisadores (2017) estudaram procedimentos de desinfecção de tomates em restaurantes da cidade de Vitória – ES, e relataram redução de 1,5 log UFC/g na contagem de AM, após imersão em solução de vinagre tinto (20 g/L ácido acético), por 15 min.

As soluções de vinagre de maçã e mel apresentaram melhores resultados que o hipoclorito de sódio em relação às amostras de alface. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento com a solução clorada e o enxágue com água destilada esterilizada nas amostras de alfaces (tabela 2). Nascimento e colaboradores (2003) observaram redução de 2,4 UFC/g de AM, após a imersão de amostras de alfaces em solução de vinagre (10 g/L), por 15 min. Por outro lado, nesse mesmo estudo os autores empregaram solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L e obtiveram resultados semelhantes aos obtidos com as soluções de vinagre, diferentemente do observado no presente estudo.

Bencardino, Vitali e Petrelli (2018) observaram redução de apenas 1,25 log UFC/g na contagem inicial de AM, após 30 min de imersão de amostras de alface em solução de vinagre (1,0 g/L de ácido acético). A baixa concentração de ácido acético utilizada neste estudo explica a baixa eficiência da solução de vinagre.



**Figura 2** – Eletromicrografias das amostras de pepino submetidas aos procedimentos de desinfecção.

a) Amostra de pepino antes do procedimento de desinfecção; b) Após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L; c) Após a desinfecção com solução de vinagre de mel orgânico a 23 % (v/v); d) Após a desinfecção com solução de vinagre de maçã orgânico a 23 % (v/v).

Em relação às amostras de pepino, todas as soluções desinfetantes mostraram menor desempenho, uma vez que todos os tratamentos tiveram resultados equivalentes aos alcançados com o enxágue em água destilada esterilizada. Koseki e pesquisadores (2004) observaram redução de 1,2 log UFC na contagem total de AM em amostras de pepino após imersão em solução de hipoclorito a 0,15 g/L. Nastou e colaboradores (2012) relataram que a imersão de pepinos artificialmente contaminados com *Listeria monocytogenes* em solução de ácido acético glacial 15 g/L por 5 min. reduziu a contagem em apenas 1,1 log UFC/g.

O cloro é amplamente utilizado para a desinfecção de frutas e hortaliças (RICO et al., 2007). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

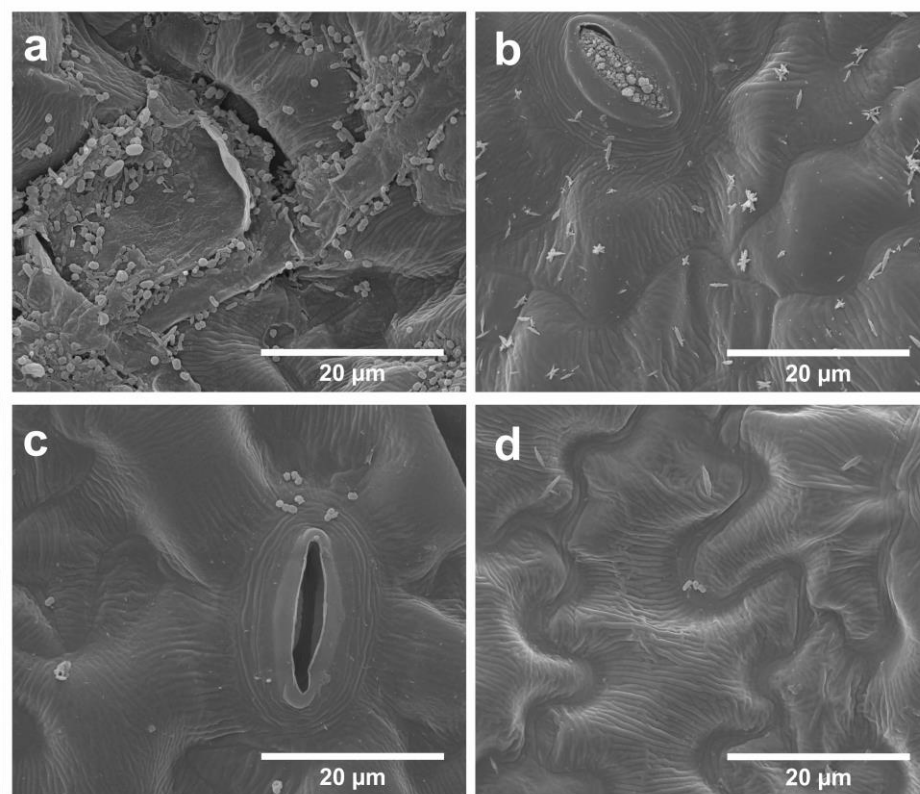
permite a utilização de compostos clorados para a desinfecção de alimentos. Por outro lado, o aumento do número de surtos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo alimentos de origem vegetal, em países desenvolvidos como os Estados Unidos, levantou dúvidas sobre a eficiência destes produtos. As reduções das populações microbianas alcançadas pelas lavagens com cloro na maioria dos estudos (BEUCHAT, 1999; NTHENGE et al., 2007) são equivalentes às obtidas pelas lavagens apenas com a água (KESKINEN; BURKE; ANNOUS, 2009).

As soluções de vinagre testadas foram equivalentes, ou superiores à solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L. Esse resultado é bastante relevante, uma vez que os vinagres são produtos obtidos por via fermentativa, e por isso são mais sustentáveis para o meio ambiente. Além disso, os vinagres são constituídos por ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético, que são considerados GRAS e não causam malefícios a saúde humana (MACHADO et al., 2017), diferente do cloro, que pode reagir com a matéria orgânica e formar compostos carcinogênicos (ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009).

Os resultados obtidos nas amostras de pepino reforçam o conceito de que os mesmos desinfetantes nas mesmas concentrações podem ter diferentes resultados na redução da população microbiana quando aplicados em diferentes alimentos (LIMA et al., 2013). Segundo Yuk, Bartz e Schneider (2006) as irregularidades, fissuras e depressões presentes na superfície dos vegetais podem abrigar os microrganismos e protegê-los da ação dos desinfetantes. A figura 2 mostra a característica irregular da superfície do pepino. As características físico-químicas das superfícies (rugosidade e hidrofobicidade) influenciam a ação dos desinfetantes.

A dificuldade em remover os microrganismos presentes na superfície dos alimentos, principalmente daqueles que se multiplicaram naturalmente nos alimentos, pode ser explicada pelos mecanismos de adesão que os microrganismos dispõem. Após o estágio inicial de colonização bacteriana na superfície do alimento, as células podem formar biofilme, os quais constituem-se de microrganismos imobilizados em uma matriz polimérica, genericamente denominadas polímeros extracelulares (LIMA et al., 2013). A formação de biofilme inicia-se com a adesão do microrganismo ao substrato. Esta adesão depende de vários fatores físico-químicos, tais como textura da superfície (rugosidade ou lisura), carga elétrica da superfície celular, hidrofobicidade, pH e temperatura (SREY; JAHID; HA, 2013).

A elevada carga microbiana presente nos alimentos analisados neste estudo, indicam provável existência de biofilmes. Segundo Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), para se considerar biofilme, é necessário um número mínimo de microrganismos de 7 log UFC/cm<sup>2</sup>. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a observação das bactérias e da arquitetura do biofilme, além das características morfológicas do substrato e a interação deste com os microrganismos aderidos (DI CICCIO et al., 2015).

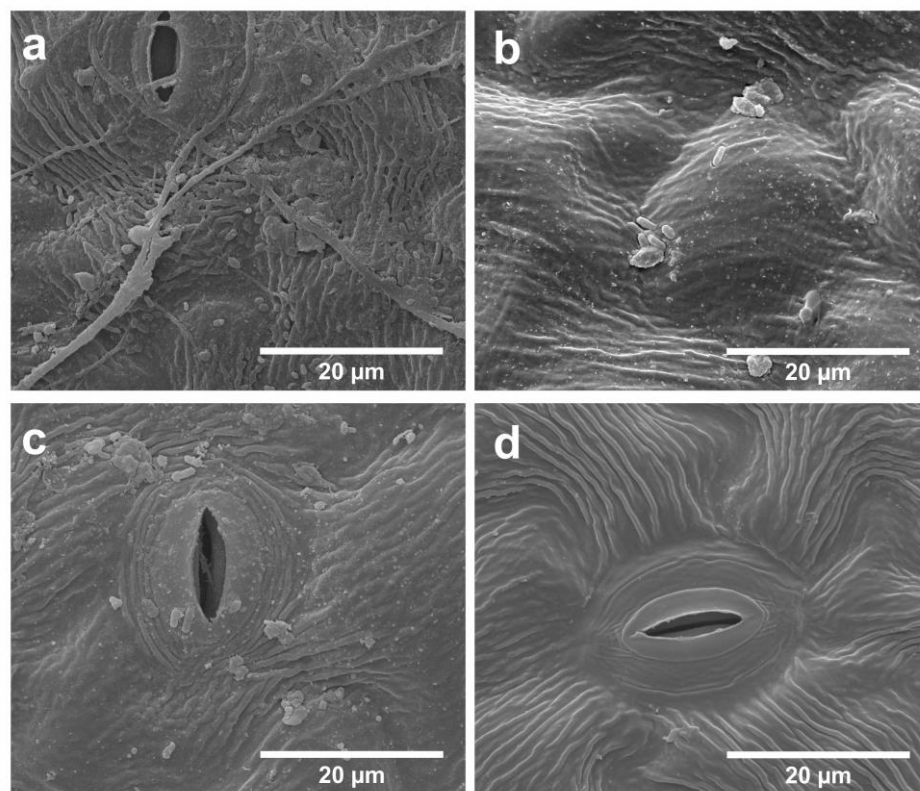


**Figura 3** – Eletromicrografias das amostras de alface submetidas aos procedimentos de desinfecção.

a) Amostra de alface antes do procedimento de desinfecção; b) Após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L; c) Após a desinfecção com solução de vinagre de mel orgânico a 23 % (v/v); d) Após a desinfecção com solução de vinagre de maçã orgânico a 23 % (v/v).

As eletromicrografias das amostras de alface submetidas aos diferentes procedimentos de desinfecção são mostradas na figura 3. Nas imagens das amostras de alface e salsinha antes do procedimento de desinfecção (imagens a das figuras 3 e 4) foi possível observar uma grande variedade de microrganismos presentes na superfície deste alimento. As imagens reforçaram os resultados observados nas contagens totais de AM, sendo que todos os procedimentos de desinfecção testados reduziram consideravelmente a contaminação microbiana.

Lima e pesquisadores (2013) estudaram as características físico-químicas da superfície de alfaces, tais como a rugosidade e a hidrofobicidade. Estes autores observaram que as folhas de alfaces cultivadas no sistema hidropônico apresentaram superfície mais rugosa e hidrofóbica que as alfaces cultivadas no sistema convencional. A rugosidade exerce importante papel na adesão bacteriana e formação de biofilmes (KATAINEN et al., 2006), e tem sido relatado que as bactérias aderem preferencialmente às superfícies mais rugosas, devido à maior área de superfície disponível para a adesão e à proteção contra as forças de cisalhamento (ARAÚJO et al., 2010). Estas características topológicas da alface podem explicar o menor desempenho da solução de hipoclorito a 0,2 g/L nas amostras de alface, além disso o cloro tem menor poder de penetração, e estruturas como os estômatos, podem proteger as bactérias da ação desinfetante.

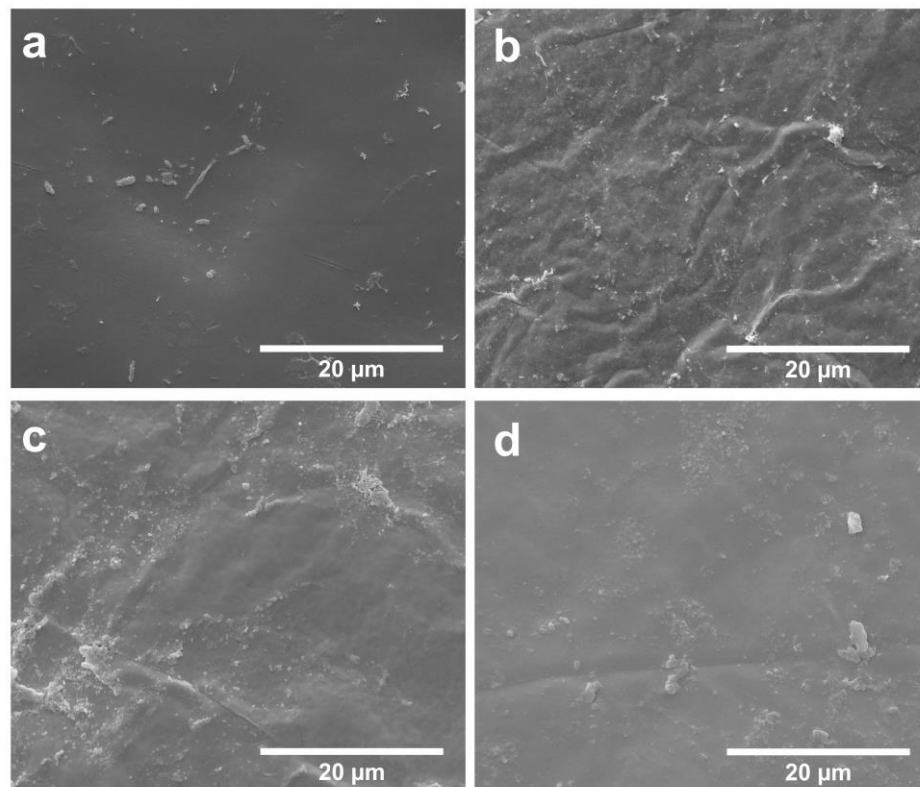


**Figura 4** – Eletromicrografias das amostras de salsinha submetidas aos procedimentos de desinfecção.

a) Amostra de salsinha antes do procedimento de desinfecção; b) Após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L; c) Após a desinfecção com solução de vinagre de mel orgânico a 23 % (v/v); d) Após a desinfecção com solução de vinagre de maçã orgânico a 23 % (v/v).

Fernandes e colaboradores (2014) avaliaram a rugosidade da superfície de mangas e tomates, e observaram que as mangas apresentavam

superfície mais rugosa que os tomates. Esta característica favoreceu a aderência da *S. Typhimurium* sobre a manga. Zhou e pesquisadores (2017) observaram que a superfície da casca do pepino apresenta alta rugosidade, o que pode explicar a forte aderência das bactérias à sua superfície e a deficiência das soluções desinfetantes testadas no presente trabalho sobre este tipo de alimento. A maior rugosidade da superfície é comumente considerada como a possível causa das grandes discrepâncias observadas entre as predições teóricas e as observações experimentais do comportamento de adesão das bactérias na superfície dos alimentos (ARAÚJO et al., 2010).



**Figura 5** – Eletromicrografias das amostras de tomate submetidas aos procedimentos de desinfecção.

a) Amostra de tomate antes do procedimento de desinfecção; b) Após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L; c) Após a desinfecção com solução de vinagre de mel orgânico a 23 % (v/v); d) Após a desinfecção com solução de vinagre de maçã orgânico a 23 % (v/v).

## CONCLUSÃO

As soluções de vinagres de maçã e mel orgânicos a 23 % (v/v) mostraram ser eficazes na remoção da contaminação microbiana presente naturalmente nos alimentos. Ambos os tratamentos alcançaram reduções, em média de 2 ciclos log, na contagem total de AM em amostras de tomate cereja, salsinha e alface. Os resultados obtidos na desinfecção das amostras de alface com soluções de vinagre foram superiores a solução de hipoclorito de sódio a 0,2 g/L. As amostras de pepino japonês foram as mais difíceis de desinfetar, e todos os resultados dos tratamentos de desinfecção testados foram semelhantes ao enxágue com água. Os resultados mostram que a escolha do método de desinfecção apropriado para cada tipo de vegetal é muito importante. A maioria dos estudos usam alimentos folhosos na avaliação de procedimentos de desinfecção e é importante ter cautela ao se extrapolar esses resultados para outros tipos de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual de Londrina e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro. E ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 833–838, 1998. Disponível em: <<http://www.jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-61.7.833>>
- ARAÚJO, E. A.; DE ANDRADE, N. J.; DA SILVA, L. H. M.; DE CARVALHO, A. F.; DE SILVA, C. A. S.; RAMOS, A. M. Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 321–332, 2010.
- BANG, H. J.; PARK, S. Y.; KIM, S. E.; MD FURKANUR RAHAMAN, M.; HA, S. Do. Synergistic effects of combined ultrasound and peroxyacetic acid treatments against *Cronobacter sakazakii* biofilms on fresh cucumber. **LWT – Food Science and Technology**, [s. l.], v. 84, p. 91–98, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.037>>
- BENCARDINO, D.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D. Microbiological evaluation of ready-to-eat iceberg lettuce during shelf-life and effectiveness of household washing

methods. **Italian Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/view/6913>>

BEUCHAT, L. R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 62, n. 8, p. 845–9, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456734>>

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, [s. l.], v. 50, p. 930–936, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>>

FERNANDES, P. É.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; ZERDAS, E. R. M. A.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, C. M.; SILVA, L. D. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin. **Food Control**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 21–26, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.024>>

INATSU, Y.; WEERAKKODY, K.; BARI, M. L.; HOSOTANI, Y.; NAKAMURA, N.; KAWASAKI, S. The efficacy of combined (NaClO and organic acids) washing treatments in controlling *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and spoilage bacteria on shredded cabbage and bean sprout. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 85, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.042>>

KATAINEN, J.; PAAJANEN, M.; AHTOLA, E.; PORE, V.; LAHTINEN, J. Adhesion as an interplay between particle size and surface roughness. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 304, n. 2, p. 524–529, 2006.

KESKINEN, L. A.; BURKE, A.; ANNOUS, B. A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 132, n. 2–3, p. 134–140, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.006>>

KOSEKI, S.; YOSHIDA, K.; ISOBE, S.; ITOH, K. Efficacy of acidic electrolyzed water for microbial. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1247–1251, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo. 4ª edição. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

LIMA, P. M.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; ANDRADE, N. J.; PIRES, A. C. S.; FERREIRA, S. O. Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of *Salmonella* Enteritidis. **Food Control**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 157–161, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.039>>

- MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. da S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 475–481, 2010.
- MACHADO, C. M. M.; LYRA, G. R.; SILVA, E. M. M.; SÃO JOSÉ, J. F. B. Sanitization protocols applied to commercial restaurants: Effects on natural contaminant microbiota and *Salmonella enterica* Enteritidis adhered on tomatoes. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 11, n. 46, p. 1649–1656, 2017. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/3F4D74C67083>>
- NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, A. K. C. Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 66, n. 9, p. 1697–1700, 2003.
- NASTOU, A.; RHOADES, J.; SMIRNIOTIS, P.; MAKRI, I.; KONTOMINAS, M.; LIKOTRAFITI, E. Efficacy of household washing treatments for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 247–253, 2012.
- NTHENGE, A. K.; WEESE, J. S.; CARTER, M.; WEI, C.-I.; HUANG, T.-S. Efficacy of gamma radiation and aqueous chlorine on *Escherichia coli* O157:H7 in hydroponically grown lettuce plants. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 748–52, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388070>>
- OLIIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.
- OLIVEIRA, A. B. A. De. Comparison of different washing and disinfection protocols used by food services in Southern Brazil for lettuce (*Lactuca sativa*). **Food and Nutrition Sciences**, [s. l.], v. 3, n. January, p. 28–33, 2012.
- ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 686–693, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>>
- PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRETT, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 2, n. s1, p. 161–173, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x>>
- PARK, K. M.; BAEK, M.; KIM, H. J.; KIM, S.; KOO, M. Susceptibility of foodborne pathogens isolated from fresh - cut products and organic vegetable to organic acids and sanitizers. **Journal of Food Hygiene Safety**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 1229–1153, 2013.

- POIMENIDOU, S. V.; BIKOULI, V. C.; GARDELI, C.; MITSI, C.; TARANTILIS, P. A.; NYCHAS, G. J.; SKANDAMIS, P. N. Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157: H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 220, p. 6–18, 2016.
- PRADO-SILVA, L.; CADAVEZ, V.; GONZALES-BARRON, U.; REZENDE, A. C. B. Meta-analysis of the effects of sanitizing treatments on *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 : H7, and *Listeria monocytogenes* inactivation. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 23, p. 8008–8021, 2015.
- RAMOS, B.; BRANDÃO, T. R. S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L. M. Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce. **Food Control**, [s. l.], v. 42, p. 38–42, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.029>>
- RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 373–386, 2007.
- SENGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella* Typhimurium on carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 301–305, 2004.
- SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>>
- YUK, H.; BARTZ, J. A.; SHNEIDER, K. R. The effectiveness of sanitizer treatments in inactivation of *Salmonella* spp. from bell pepper, cucumber, and strawberry. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 71, n. 3, p.95 - 99, 2006.
- ZHOU, J.; MENG, Y.; WANG, M.; MEMON, M. S.; YANG, X. Surface roughness estimation by optimal tactile features for fruits and vegetables. **International Journal of Advanced Robotic Systems**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–8, 2017.

## Artigo II - Comparison of the efficiency of chlorine and organic acid solutions in reducing *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in food

Natália Harumi Niguma, Wilma Aparecida Spinosa, Tereza Cristina R. M de Oliveira

**Abstract** The bactericidal activity of lactic acid (LA), glacial acetic acid (AA), apple cider vinegar, and chlorine solutions against *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* was determined following the methods of the Association of Official Analytical Chemists. The bactericidal efficiency of these solutions was evaluated using tomato, lettuce, parsley, and cucumber samples artificially contaminated with *E. coli* and *E. faecalis* suspensions. Seven organic acid solutions, namely, solution A (15 g/L LA), solution B (15 g/L AA), solution C (15 g/L AA + 10 g/L LA), solution D (15 g/L AA + 15 g/L LA), solution E (vinegar solution containing 15 g/L AA), solution F (10 g/L LA + vinegar solution containing 15 g/L AA), and solution G (15 g/L LA + vinegar solution containing 15 g/L AA), and a chlorine solution containing 0.2 g/L sodium hypochlorite (solution H) were tested. Solution H killed *E. coli* and *E. faecalis* in culture media in less than 1 min; however, it was less efficient than organic acid solutions in reducing bacterial counts in foods. Solutions C and F reduced *E. coli* and *E. faecalis* counts in food samples by 4 and 2 log CFU/g, respectively. The results indicate that it is possible to use organic acid solutions instead of chlorine solutions for disinfecting fresh produce.

**Keywords:** vegetables; lactic acid; acetic acid; vinegar; non-chlorine sanitizer

### Introduction

The increasing incidence of outbreaks of foodborne diseases associated with the consumption of vegetables has raised concerns about the safety of fresh produce (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018; LINDEN et al., 2016; NEAL et al., 2012). These foods are usually consumed raw, and common decontamination measures include washing and disinfection (GIL et al., 2009).

Chlorinated water (0.02–0.2 g/L chlorine) is widely used to disinfect fruits and vegetables during processing; however, chlorine reacts with organic matter and can lead to the formation of carcinogenic compounds. Furthermore, chlorine can be inactivated by organic material (HUA; RECKHOW, 2007; HUANG; CHEN, 2011). The current trend is to eliminate the use of chlorine for food disinfection (MEIRELES;

GIAOURIS; SIMÕES, 2016; ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009). An interesting alternative is the substitution of chlorinated compounds by organic acids produced by fermentation, which are not harmful to human health and have low environmental impact.

Organic acids, such as acetic acid and lactic acid, rapidly inactivate a wide range of bacteria. An advantage of using organic acids as sanitizers is that, unlike chlorine, they do not require a post-disinfection rinsing step. Vinegar has acetic acid as its major acid component and can be used as an alternative disinfectant for food (SENGUN; KARAPINAR, 2004).

The aim of this study was to evaluate the use of acetic acid and lactic acid as alternatives to minimize the use of chlorine for food disinfection. The bactericidal activity of organic acids and chlorine solutions was determined using *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* suspensions in culture media, and the bactericidal efficiency of these solutions was evaluated using fresh produce artificially contaminated with bacteria.

## **Material and methods**

### **Bacterial strains and preparation of bacterial suspensions**

*E. coli* ATCC 25922 and *E. faecalis* ATCC 29212 strains, stored in nutrient agar, were inoculated in brain heart infusion broth (BHI; Merck®, Germany) and incubated at 37 °C for 24 h. The bactericidal activities of the disinfectant solutions were determined using bacterial suspensions adjusted to a turbidity equal to that of the 0.5 McFarland standard.

### **Combination of acids**

To evaluate the interaction between acetic and lactic acids and to assess the antibacterial effects of the combination against bacterial strains, microdilution assays employing double antimicrobial gradient were used. The microdilution was performed

in 96-well plates in triplicate according to the protocol of Nishio et al. (NISHIO et al., 2016). To evaluate the interaction between the two antimicrobials, the fractional inhibitory concentration (FIC) index was used, as described by Chin et al. (CHIN; WEITZMAN, 1997).

### Preparation of disinfectant solutions

The bactericidal activities of seven solutions of organic acids (solutions A, B, C, D, E, F, and G) and 0.2 g/L sodium hypochlorite solution (solution H) were evaluated in this study (Table 1).

**Table 1** - Disinfectant solutions and their pH values

Solution	Components	pH*
A	Lactic acid (15 g/L)	2.4 ± 0.05 <sup>e</sup>
B	Glacial acetic acid (15 g/L)	2.5 ± 0.02 <sup>c</sup>
C	Glacial acetic acid (15 g/L) + lactic acid (10 g/L)	2.2 ± 0.01 <sup>f</sup>
D	Glacial acetic acid (15 g/L) + lactic acid (15 g/L)	2.1 ± 0.01 <sup>d</sup>
E	Apple cider vinegar (15 g/L acetic acid)	3.0 ± 0.03 <sup>b</sup>
F	Apple cider vinegar (15 g/L acetic acid) + lactic acid (10 g/L)	2.3 ± 0.01 <sup>e</sup>
G	Apple cider vinegar (15 g/L acetic acid) + lactic acid (15 g/L)	2.2 ± 0.01 <sup>f</sup>
H	Sodium hypochlorite (0.2 g/L)	9.0 ± 0.02 <sup>a</sup>

\* Mean ± standard deviation. <sup>a-f</sup> Means followed by different letters are statistically different (P < 0.05).

Solution A contained lactic acid (Sigma–Aldrich<sup>®</sup>, United States) diluted to 15 g/L in distilled water. Solution B was composed of glacial acetic acid (Anidrol<sup>®</sup>, Brazil) diluted to 15 g/L in distilled water. Solutions C and D were prepared by adding lactic acid to solution B until reaching the final concentrations of 10 g/L and 15 g/L lactic acid, respectively.

Solution E contained organic apple cider vinegar with 69 g/L volatile acidity (Dom Spinosa<sup>®</sup>, Brazil), determined by titration with 0.1 mol/L sodium

hydroxide, diluted to 15 g/L in distilled water. Solutions F and G were prepared by adding lactic acid to solution E until reaching the final concentrations of 10 g/L and 15 g/L lactic acid, respectively.

Solution H was prepared from commercial bleach containing 25 g/L hypochlorite (free chlorine), determined by titration with sodium thiosulfate (Sigma–Aldrich®, United States). Bleach was diluted to 0.2 g/L chlorine according to the manufacturer’s recommendation. The pH of the solutions was determined using a pH meter (Kasvi®, Brazil). Mean pH values are shown in Table 1.

### **Bactericidal activities of disinfectant solutions**

Bactericidal activity was determined according to method 965.13 of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) for swimming pool water disinfectants, with modifications.

Bacterial suspensions and disinfectant solutions were prepared as previously described above. For each solution, two flasks containing 199 mL of solution were prepared. In one flask, 1.0 mL of *E. coli* suspension was added; and in the other, 1.0 mL of *E. faecalis* suspension. After exposure times of 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, and 10 min, a 1.0 mL aliquot was transferred from each flask to a sterile tube containing 9.0 mL of neutralizer solution. Following agitation, a 1.0 mL aliquot from each tube was inoculated into five tubes containing 9.0 mL of BHI broth, and 0.1 mL was plated onto BHI agar. Tubes and plates were incubated at 37 °C for 24 h. No bacterial growth in tubes and plates indicated that bacteria had been inactivated. The time for each solution to inactivate bacteria was measured. Experiments were conducted in triplicate. The neutralizer solution for the organic acid solutions was 0.1

mol/L diphosphate buffer (Cinética<sup>®</sup>, Brazil); and for the chlorine solution, 2.5 g/L sodium thiosulfate (Sigma–Aldrich<sup>®</sup>, United States).

## **Bactericidal efficiency of disinfectant solutions in artificially contaminated foods**

### *Vegetable samples*

Grape tomatoes (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), lettuce (*Lactuca sativa*), parsley (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*), and cucumber (*Cucumis sativus*) were purchased from the local market in Londrina, Paraná, Brazil. Cucumbers were peeled and had their seeds removed. Ten samples of each vegetable (25 g of grape tomato, 10 g of lettuce, 10 g of parsley, and 25 g of cucumber) were placed separately in sterile plastic bags. Thus, a total of 40 samples were prepared and analyzed in each replicate.

### *Inoculation of vegetable samples*

Five samples of each vegetable were contaminated with 100 mL of *E. coli* suspension, and five other samples were contaminated with 100 mL of *E. faecalis* suspension. Suspensions were diluted 1:10 in 1.0 g/L buffered peptone water (BPW) to achieve a bacterial count of 7 log CFU/mL. Bacterial suspensions were kept in contact with food samples for 30 min, after which suspensions were removed from the plastic bags. Samples were stored at 5 °C for 24 h to allow bacteria to adhere to the foods.

### *Vegetable disinfection and enumeration of *E. coli* and *E. faecalis**

For disinfection, 100 mL of solutions C, F, H, or sterile water (control) was added to one of each food sample contaminated with *E. coli* or *E. faecalis*. After 15 min of incubation at 25 °C, the solution was removed. Subsequently, 90 mL of 1.0 g/L BPW was added to parsley and lettuce samples and 225 mL of BPW was added to cucumber and tomato samples. Following homogenization for 30 s, a 10× dilution of each sample was prepared using 0.1% BPW, and 0.1 mL of each diluted solution was plated onto eosin methylene blue agar (EMB; Himedia, India) and BHI agar for enumeration of *E. coli* and *E. faecalis*, respectively. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and bacterial colonies were counted. All experiments were performed in triplicate.

One sample of each of vegetable was not disinfected. The bacterial count in this sample was considered the number of bacteria that adhered to the vegetable ( $N_0$ ).

### **Statistical analysis**

Treatment effects were estimated using  $\log (N/N_0)$ , where  $N_0$  represents the number of bacteria in the food sample prior to disinfection, and  $N$  represents the number of bacteria following disinfection (RAMOS et al., 2014). Analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate differences in bacterial elimination between treatments. Tukey's test was used for post-hoc comparisons. All tests were carried out at the significance level of  $P < 0.05$  using Statistica®.

## **Results and discussion**

### **Bactericidal activity of disinfectant solutions**

To determine the type of interaction that the AA and LA present when combined, a checkerboard assay was performed. An additive antibacterial effect was observed against two bacterial strains when both acids were combined. The MIC values of the combination were reduced to 1/2 to 1/4 in relation to the MIC values of each acid alone (table 2).

**Table 2** - MIC values of acetic and lactic acids against Gram-positive and Gram-negative bacteria

Bacterial Strains	MIC alone (%)*		MIC combined (%)*		FIC*	Interaction
	AA	LA	AA	LA		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0,25	0,25	0,125	0,06	0,74	Additive effect
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	0,25	0,25	0,06	0,125	0,74	Additive effect

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; ATCC: American Type Culture Collection. FIC: Fractional Inhibitory Concentration; AA: Acetic Acid; LA: Lactic Acid. \*Tests were performed in triplicate.

Brazilian legislation on disinfectants for fresh produce is based on the requirements of AOAC 965.13 disinfectants must be able to eliminate *E. coli* and *E. faecalis* in 0.5 min and 2 min, respectively. Table 3 shows that solutions A, B, and E, which contained only one type of organic acid, failed to eliminate *E. coli* in 10 min. The short exposure time used in this study (0.5 to 10 min) and the high bacterial count prescribed by the AOAC method may explain why solutions A, B, and E did not inactivate *E. coli*. Sengun and Karapinar (2004) (SENGUN; KARAPINAR, 2004) observed that *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) counts in artificially contaminated carrots were reduced by 1.87, 2.60, and 3.58 log CFU/g after exposure to 40 g/L vinegar solution for 15, 30, and 60 min, respectively. The results demonstrated that the duration of contact between acetic acid and bacteria was important and that the acid had residual effects.

**Table 3** - Exposure time required to inactivate *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in BHI broth using the disinfectant solutions

Disinfectants		<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
<b>A</b>	Lactic acid (15 g/L)	INS	INS
<b>B</b>	Glacial acetic acid (15 g/L)	INS	INS
<b>C</b>	Glacial acetic acid (15 g/L) + lactic acid (10 g/L)	5 min	INS
<b>D</b>	Glacial acetic acid (15 g/L) + lactic acid (15 g/L)	1 min	INS
<b>E</b>	Apple cider vinegar (15 g/L acetic acid)	INS	INS
<b>F</b>	Apple cider vinegar (15 g/L acetic acid) + lactic acid (10 g/L)	2 min	INS
<b>G</b>	Apple cider vinegar (15 g/L acetic acid) + lactic acid (15 g/L)	1 min	INS
<b>H</b>	Sodium hypochlorite (0.2 g/L)	0.5 min	0.5 min

INS: the maximum exposure time (10 min) was insufficient to eliminate the microorganism

Solutions C and F eliminated *E. coli* in 5 and 2 min, respectively, and solutions D and G were able to eliminate *E. coli* in 1 min of incubation. Solutions C and F contained 10 g/L lactic acid, and solutions D and G contained 15 g/L lactic acid. The results also showed the additive effect of organic acids. Solution C required a longer time to kill *E. coli* than solution F, even though these solutions had similar composition. The difference in results probably occurred because solution C contained glacial acetic acid whereas solution F contained vinegar. Vinegars have other components in addition to acetic acid, such as phenolic compounds and various organic acids produced during fermentation, which may increase their efficiency in eliminating microorganisms from food (NASTOU et al., 2012; RAMOS et al., 2014).

The pH values of solutions ranged from 2.2 to 2.5 (Table 1), indicating that acid molecules were predominantly in the undissociated form. The inhibitory effect of undissociated organic acids is 10 to 600 times stronger than that of their dissociated counterparts, and dissociation is directly determined by pH (HELANDER; VON WRIGHT; MATTILA-SANDHOLM, 1997). Acids induce cellular stress when they cross the plasma membrane and reduce intracellular pH. Organic

acids in the undissociated form can freely enter cells. As the pH of the cytoplasm is generally more alkaline than the extracellular pH, once inside the cytoplasm, organic acids dissociate and release protons that cause cytoplasmic acidification (RONAGHI et al., 2016).

AOAC 965.13 determines that a disinfectant solution must eliminate *E. faecalis* within 2 min. None of the organic acid-based solutions tested in the present study eliminated the bacterium in this time of exposure, probably because Gram-positive bacteria have a thick peptidoglycan layer in the cell wall, which increases resistance against mechanical and osmotic lysis. This cellular component might also promote internal homeostasis, allowing survival at extreme pH (RONAGHI et al., 2016). *E. faecalis* can survive to temperatures of approximately 60 °C for 30 min at neutral pH, are able to grow over a wide range of pH values (3.5 to 11), and tolerate high NaCl concentrations (6.5%) (FLAHAUT et al., 1996; GARDINI et al., 2001). The ability of this bacterium to resist heating and acidification makes its inactivation difficult, which raises concerns regarding the elimination of *E. faecalis* in the food industry (FLAHAUT et al., 1996; LENZ; HEW FERSTL; VOGEL, 2010). Solution H killed *E. faecalis* as well as *E. coli* in 0.5 min, in accordance with the requirements of AOAC 965.13.

### **Efficiency of organic acid and chlorine solutions in disinfecting artificially contaminated foods**

Solutions C and F were selected for evaluation of bactericidal efficiency because these solutions promoted *E. coli* inactivation in 5 min and contained a low concentration of lactic acid, which reduces formulation costs. We

compared the performance of these solutions with that of sodium hypochlorite solution using an exposure time of 15 min.

Table 4 shows that solutions C and F reduced *E. coli* counts in the foods analyzed by an average of 4 log CFU/g. Using single organic acid solutions, other authors found lower reductions in bacterial count than those obtained in this study. São José, de Medeiros, Bernardes and de Andrade (2014) (S??O JOS?? et al., 2014) reported that 10 g/L lactic acid and 10 g/L acetic acid solutions, applied individually, reduced the counts of *S. enterica* serovar Enteritidis and *E. coli* by approximately 2 log CFU/cm<sup>2</sup> in green pepper and melon. Torriani, Orsi and Vescovo (1997) (TORRIANI; ORSI; VESCOVO, 1997) reported that a 10 g/L acetic acid solution reduced total and thermotolerant coliforms counts by 2.0 and 1.0 log CFU/g, respectively, in mixed salads containing carrots, endive, arugula, and chicory. Sagong et al. (2011) (SAGONG et al., 2011) reported that 2.0% lactic acid reduced the counts of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated organic lettuce by 1.74, 1.73, and 1.30 log CFU/g, respectively. The results of the present study clearly indicate the additive effects of acetic acid and lactic acid on food disinfection.

**Table 4** - Antibacterial activities of solutions C, F, and H against *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in artificially contaminated foods

Bacteria	Sample	Disinfectants			
		Solution C	Solution F	Solution H	Control
Reduction factor (Log (N/N <sub>0</sub> )*)					
<i>E. coli</i>	Lettuce	3.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>c</sup>
	Cucumber	3.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>c</sup>
	Tomato	3.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.2 <sup>b</sup>
	Parsley	4.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i>	Lettuce	2.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>b</sup>
	Cucumber	2.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.6 <sup>ab</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>
	Tomato	2.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.7 <sup>c</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>bc</sup>
	Parsley	2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>a</sup>

Solution C: acetic acid (15 g/L) + lactic acid (10 g/L); Solution F: apple cider vinegar (15 g/L acetic acid) + lactic acid (10 g/L); Solution H: sodium hypochlorite (0.2 g/L); Control: sterile water. \* Mean ± standard deviation. <sup>a-c</sup> Means followed by different letters within rows differ significantly (P < 0.05)

Immersion of samples in sterile water was performed as a control to evaluate the effect of rinsing on the reduction of microorganisms. Table 3 shows that the decrease in *E. coli* count caused by washing under sterile water was lower than that achieved by disinfection with solutions C and F. However, washing had a similar effect to that of solution H on grape tomato and parsley.

Solution H reduced *E. coli* counts by 1.77 log CFU/g in lettuce and by an average of 2 log CFU/g in other vegetables; bacterial count reductions obtained with solutions C and F were twice as high as those promoted by solution H. Solutions with chlorine concentrations ranging from 0.05 to 0.2 g/L are routinely used for disinfection of fresh foods (KESKINEN; BURKE; ANNOUS, 2009), a procedure that is permitted by Brazilian legislation. However, chlorine can be inactivated by organic material (HUANG; CHEN, 2011) and might not be capable of completely eliminating bacteria from food. Baert et al. (2009) (BAERT et al., 2009) observed a significant loss in the efficiency of active chlorine during disinfection of lettuce.

Al-Nabulsi et al. (2014) [24] used a 0.2 g/L chlorine solution for disinfection of mixed salad samples (lettuce, spinach, and celery) and observed that *E. coli* O157:H7 counts per leaf were reduced by less than 1.0 log CFU. Huang and Chen (2011) (HUANG; CHEN, 2011) investigated the efficiency of chlorinated water (0.2 g/L) in disinfecting spinach leaves artificially contaminated with *E. coli* O157:H7 and reported reductions of only 1.2 log CFU/g.

Solutions C and F did not eliminate *E. faecalis* in BHI broth; however, a mean reduction of 2.2 log CFU/g in *E. faecalis* count was observed in artificially contaminated foods. Similar results were obtained using solution H, except in lettuce samples, in which H was less effective in reducing *E. faecalis* than C and F. Other studies have also reported reductions of 2.0 log CFU/g or less of Gram-positive bacteria by the action of organic acids, which reinforces that organic acid solutions are less capable of eliminating this bacterial group (AKBAS; ÖLMEZ, 2007; SAGONG et al., 2011; ZHANG, 1996). Nastou et al. (2012) used 1.5% acetic acid to disinfect lettuce, cucumber, and parsley artificially contaminated with *L. monocytogenes* and obtained reductions of 1.2, 1.1, and 2.0 log CFU/g, respectively used balsamic vinegar of Modena at 20, 37, and 50% (v/v) (12, 22, and 29 g/L acetic acid) for the disinfection of lettuce artificially contaminated with *L. monocytogenes* and obtained reductions of 1.3, 1.5, and 2.15 log CFU/g, respectively (NASTOU et al., 2012).

Immersion of fresh vegetables artificially contaminated with *E. faecalis* in sterile water reduced bacterial count. However, disinfection of lettuce and cucumber with C and F was more effective than rinsing with water (Table 4). Solution C had the same effect on tomato samples as water rinsing. In parsley samples, all treatments were as effective as water rinsing.

The tested solutions were not able to entirely eliminate contamination of foods because bacteria adhere onto food surfaces in such a way that hampers contact with disinfectants (BRACKETT, 1992; SEO; FRANK, 1999). In addition, bacteria can form biofilms, which makes the contact between disinfectant and microorganism even more difficult (KESKINEN; BURKE; ANNOUS, 2009; SEO; FRANK, 1999).

Notably, no significant differences were observed between the results of solutions C and F. Therefore, the vinegar-based solution (F) is more convenient, as vinegar is obtained by fermentation, which is more sustainable than the production of acetic acid by chemical processing. Additionally, it is interesting to encourage the use of vinegar for food disinfection because it is a low-cost product and does not require rinsing following application.

The results indicate that it is possible to replace chlorine solutions with 15 g/L glacial acetic acid (solution C) or a vinegar solution containing 15 g/L acetic acid + 10 g/L lactic acid (solution F) for food disinfection. Chlorine solution was less efficient than organic acid solutions in reducing bacterial counts in artificially contaminated vegetables, possibly because of the presence of organic matter.

### **Acknowledgments**

The authors thank the Londrina State University and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for the financial support.

### **References**

AKBAS, M. Y.; ÖLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 619–624, 2007.

BAERT, Leen et al. Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce

murine *norovirus* 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce and in residual wash water. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 1047–54, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517733>>

BRACKETT, Robert E. Shelf Stability and Safety of Fresh Produce as Influenced by Sanitation and Disinfection. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 808–814, 1992. Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-55.10.808>>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **List of selected multistate foodborne outbreaks investigations**. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>>. Acesso em: 10 set. 2018.

CHIN, N.; WEITZMAN, I. In Vitro Activity of Fluvastatin , a Cholesterol-Lowering Agent , and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. [s. l.], v. 41, n. 4, p. 850–852, 1997.

FLAHAUT, Sigrid et al. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 138, n. 1, p. 49–54, 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08133.x>>

GARDINI, Fausto et al. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. 1–2, p. 105–117, 2001.

GIL, Maria I. et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 134, n. 1–2, p. 37–45, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021>>

HELANDER, I. M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against Gram-negative bacteria. **Trends Food Sci. Technology**, [s. l.], v. 8, p. 146–150, 1997.

HUA, Guanghui; RECKHOW, David A. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. **Water Research**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1667–1678, 2007.

HUANG, Yaoxin; CHEN, Haiqiang. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. **Food Control**, [s. l.], 2011.

KESKINEN, Lindsey A.; BURKE, Angela; ANNOUS, Bassam A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 132, n. 2–3, p. 134–140, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.006>>

LENZ, Christian A.; HEW FERSTL, Carrie M.; VOGEL, Rudi F. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 317–326, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.008>>

LINDEN, Inge Van Der et al. Minimal processing of iceberg lettuce has no substantial influence on the survival, attachment and internalization of *E. coli* O157 and *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 238, p. 40–49, 2016.

MEIRELES, Ana; GIAOURIS, Efstathios; SIMÕES, Manuel. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. **FRIN**, [s. l.], v. 82, p. 71–85, 2016.

NASTOU, Aikaterini et al. Efficacy of household washing treatments for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 247–253, 2012.

NEAL, Jack A. et al. Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. **Food Research International**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 1123–1128, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.011>>

NISHIO, E. K. et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. February, p. 1–8, 2016.

ÖLMEZ, Hülya; KRETZSCHMAR, Ursula. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 686–693, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>>

RAMOS, B. et al. Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce. **Food Control**, [s. l.], v. 42, p. 38–42, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.029>>

RONAGHI, Maryam et al. A comparison of the bactericidal effectiveness of hydrochloric and acetic acid on *Staphylococcus aureus* in silver carp during a pH-shift protein recovery process. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 239–243, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.043>>

SÃO JOSÉ, Jackline Freitas Brilhante De et al. Removal of *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* from green peppers and melons by ultrasound and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 190, p. 9–13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.015>>

SAGONG, Hun Gu et al. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on

organic fresh lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 287–292, 2011. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.010>>

SENGUN, Ilkin Yucel; KARAPINAR, Mehmet. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella* Typhimurium on carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 301–305, 2004.

SEO, K. H.; FRANK, J. F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to Lettuce Leaf Surface and Bacterial Viability in Response to Chlorine Treatment as Demonstrated by Using Confocal Scanning Laser Microscopy. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 3–9, 1999.

TORRIANI, Sandra; ORSI, Carla; VESCOVO, Marisa. Potential of *Lactobacillus casei*, Culture Permeate, and Lactic Acid To Control Microorganisms in Ready-To-Use Vegetables. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 1564–1567, 1997. Disponível em:  
<<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1997/00000060/00000012/art00016>>

ZHANG, S. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 311–321, 1996. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002096900374>>

## 5 CONCLUSÃO

A utilização dos ácidos orgânicos e dos fermentados acéticos estudados neste trabalho mostraram ser eficientes na redução da população microbiana presente tanto em alimentos naturalmente quanto artificialmente contaminados.

O ensaio *checkerboard* revelou o efeito aditivo entre os ácidos acético e láctico. A aplicação da mistura destes ácidos, assim como a adição de ácido láctico ao vinagre de maçã orgânico mostrou atividade desinfetante superior a solução de hipoclorito de sódio sobre alimentos artificialmente contaminados com *E. coli*. Estas combinações alcançaram reduções, em média de 4 log UFC/g. Por outro lado, infelizmente, estas substâncias tiveram desempenho reduzido sobre as cepas de *E. faecalis*, no entanto, os ácidos orgânicos estudados mantiveram a mesma eficiência que o hipoclorito de sódio, que é o principal desinfetante utilizado tanto a nível doméstico quando industrial. Ambos os tratamentos foram capazes de reduzir, em média 2 log UFC/g.

Os microrganismos naturalmente presentes na superfície dos alimentos, foram mais difíceis de serem inativados. Todos os procedimentos de desinfecção estudados, puderam reduzir a contaminação microbiana cerca de 2 ciclos log. As características morfológicas da superfície dos alimentos mostraram importante influência sobre a atividade antimicrobiana de todos os desinfetantes estudados. Uma vez que alimentos com superfície mais rugosa, como o caso do pepino japonês, mostraram ser muito mais difíceis de desinfetar.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o método de desinfecção utilizado, principalmente em escala industrial, deve ser minuciosamente estudado. Uma vez que ficou evidente que o mesmo desinfetante na mesma concentração podem alcançar resultados muito diferentes dependendo da característica do alimento. Não sendo recomendável, que os resultados obtidos em determinado alimento seja extrapolado para outros tipos de alimentos.

## REFERÊNCIAS

- AKBAS, M. Y.; ÖLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 619–624, 2007a.
- AKBAS, M. Y.; ÖLMEZ, H. Effectiveness of organic acids, ozonated water and chlorine dippings on microbial and storage quality of fresh-cut iceberg lettuce. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v.87, p. 2609-2616, 2007b.
- ALLENDE, A.; MCEVOY, J.; TAO, Y.; LUO, Y. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. **Food Control**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 230–234, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.009>>
- AL-NABULSI, A. .; OSAILI, T. M.; OBAIDAT, H. M.; SHAKER, R. R.; AWAISHEH, S. S.; HOLLEY, R. A. Inactivation of Stressed *Escherichia coli* O157:H7 cells on the surfaces of rocket salad leaves by chlorine and peroxyacetic acid. **Journal of Food Protection**, v. 11, n. 1, p. 32-39, 2014.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 833–838, 1998. Disponível em: <<http://www.jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-61.7.833>>
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe técnico nº 51/2012 - GGALI/GGSAN/ANVISA**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+Técnico+no+51+de+2012/1f1de8d0-920c-45d8-8959-d4d9d114274a>. Acesso em 12.set.2017.
- AOAC (Association Official Analytical Chemists). Official Method 965.13 Disinfectantes (water) for swimming pools. **AOAC Official Methods of Analysis**, 19<sup>th</sup> ed. Gaithersburg. Chapter 6, p.42-44, 2012.
- AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., & LIMA, U. A. (2001). Vinagres. In: O. ZANCANARO Jr., **Biotecnologia industrial** (Vol. 4, pp. 183-208). São Paulo: Edgard Blücher.
- AQUARONE, E., LIMA, U. A., & BORZANI, W. (1983). Vinagres. In: E. AQUARONE, & O. ZANCANARO Jr., **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação** (Vol. 5, pp. 104-122). São Paulo, SP, BRASIL: Edgard Blücher.
- ARAÚJO, E. A.; DE ANDRADE, N. J.; DA SILVA, L. H. M.; DE CARVALHO, A. F.; DE SILVA, C. A. S.; RAMOS, A. M. Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 321–332, 2010.
- ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of *Enterococcus*: beyond the vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 266 - 278, 2012.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 1751–1773, 2010.

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

BAERT, L.; VANDEKINDEREN, I.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN COILLIE, E.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce murine norovirus 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce and in residual wash water. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1047–54, 2009.

BANG, H. J.; PARK, S. Y.; KIM, S. E.; MD FURKANUR RAHAMAN, M.; HA, S. Do. Synergistic effects of combined ultrasound and peroxyacetic acid treatments against *Cronobacter sakazakii* biofilms on fresh cucumber. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 84, p. 91–98, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.037>>

BELL, K. Y.; CUTTER, C. N.; SUMNER, S. S. Reduction of foodborne microorganisms on beef carcass tissue using acetic acid, sodium bicarbonate, and hydrogen peroxide spray washes. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 439, 1997. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031259918&partnerID=40&md5=06d5e4f12ed2f91b2d0f7ba44178da32>>

BENCARDINO, D.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D. Microbiological evaluation of ready-to-eat iceberg lettuce during shelf-life and effectiveness of household washing methods. **Italian Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/view/6913>>

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

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. **Food Control**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 82–90, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.073>>

BEUCHAT, L. R. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. World Health Organization. **Food Safety Team & Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Geneva : World Health Organization. 1998. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/64435>. Acesso em: 20.05.2017

BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 808–814, 1992. Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-55.10.808>>

BRASIL. Resolução RDC nº 275. de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados e a Lista de Verificação das Boas

- Práticas de Fabricação aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília. DF. 06 nov. 2002.
- BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 1–2, p. 1–17, 1999.
- BRENES, C.H. Good Manufacturing Practices (GMPs) - **Buenas prácticas para la manipulación, embalage, almacenamiento y transporte de productos frescos**. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual para formación para instructores. Campus Monterrey, México, 2002.
- BUCHHOLZ, U. et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. **The New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 365, n. 19, p. 1763-1770, 2011.
- CALLEJÓN, R. M.; RODRÍGUEZ-NARANJO, M. I.; UBEDA, C.; HORNEDO-ORTEGA, R.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 32–38, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2014.1821>>
- CENCI, S. A. Boas Práticas de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças na Agricultura Familiar. In: NETO, F.N. (Org.). **Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar**. 1a ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2006. Cap. 3, p. 65-80.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **List of selected multistate foodborne outbreaks investigations**. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>. Acesso em: 10.set.2018.
- CHANG, J. M.; FANG, T. J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 7–8, p. 745–751, 2007.
- CHIN, N.; WEITZMAN, I. In Vitro Activity of Fluvastatin , a Cholesterol-Lowering Agent , and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 850–852, 1997.
- COOTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.
- CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Informe – NET DTA 2011 - Surto de síndrome hemolítico-urêmica associado à *Escherichia coli* O104:H4, na Alemanha, maio-junho de 2011.** Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/SHU11\\_ALERTA0507.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/SHU11_ALERTA0507.pdf) Acesso em: 20 jul 2017.

DELAQUIS, P. J.; STEWART, S.; TOIVONEN, P. M. A.; MOYLS, A. L. Effect of warm, chlorinated water on the microbial flora of shredded iceberg lettuce. **Food Research International**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 7–14, 1999.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 41, n. 3–4, p. 261–268, 1998.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, [s. l.], v. 50, p. 930–936, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>>

DICKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 133–140, 1992.

ERICKSON, M. C. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 283–310, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-022811-101211>>

FERNANDES, G. R. **Sanitizantes na qualidade microbiológica, física e química de morangos ( *Fragaria x Ananassa Duch* ) minimamente processados.** 2013. 77 f. Tese de doutorado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

FERNANDES, P. É.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; ZERDAS, E. R. M. A.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, C. M.; SILVA, L. D. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin. **Food Control**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 21–26, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.024>>

FLAHAUT, S.; HARTKE, A.; GIARD, J.-C.; BENACHOUR, A.; BOUTINBONNES, P.; AUFRAY, Y. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, n. 1, p. 49–54, 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08133.x>>.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo. Ed. Atheneu, 2004.

FRANCO, L. G. **Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador de desempenho em frangos de corte**. 2009. 72 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre. Artmed. 2013.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CARUSO, M. C.; GALGANO, F. CRUDELE, M. A.; FAVATI, F.; GUERZONI, M. E.; SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1–2, p. 105–117, 2001.

GIL, M. I.; SELMA, M. V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 134, n. 1–2, p. 37–45, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021>>

HELANDER, I.M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against Gram-negative bacteria. **Trends Food Science & Technology**, v. 8, n. 5, p. 146–150, 1997.

HUA, G.; RECKHOW, D. A. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. **Water Research**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1667–1678, 2007.

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

INATSU, Y.; BARI, M. L.; KAWASAKI, S.; ISSHIKI, K.; KAWAMOTO, S. Efficacy of acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese cabbage. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 251–255, 2005.

INATSU, Y.; WEERAKKODY, K.; BARI, M. L.; HOSOTANI, Y.; NAKAMURA, N.; KAWASAKI, S. The efficacy of combined (NaClO and organic acids) washing treatments in controlling *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and spoilage bacteria on shredded cabbage and bean sprout. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 85, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.042>>

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo. 4ª edição. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro818>>

KARAPINAR, M.; GÖNÜL, Ş. A. Removal of *Yersinia enterocolitica* from fresh parsley by washing with acetic acid or vinegar. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 261–264, 1992.

KATAINEN, J.; PAAJANEN, M.; AHTOLA, E.; PORE, V.; LAHTINEN, J. Adhesion as an interplay between particle size and surface roughness. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 304, n. 2, p. 524–529, 2006.

KESKINEN, L. A.; BURKE, A.; ANNOUS, B. A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 132, n. 2–3, p. 134–140, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.006>>

KOSEKI, S.; YOSHIDA, K.; ISOBE, S.; ITOH, K. Efficacy of acidic electrolyzed water for microbial. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1247–1251, 2004.

KOTTWITZ, L. B. M., et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 32, p. 9 – 15, 2010.

KROUPITSKI, Y.; PINTO, R.; BELAUSOV, E.; SELA, S. Distribution of *Salmonella* Typhimurium in romaine lettuce leaves. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 990–997, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.007>>

LEADER, B. T.; FRYE, J. G.; HU, J.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BOYLE, D. S. High-throughput molecular determination of *Salmonella enterica* serovars by use of multiplex PCR and capillary electrophoresis analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 1290–1299, 2009.

LENZ, C. A.; HEW FERSTL, C. M.; VOGEL, R. F. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 317–326, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.008>>.

LIMA, P. M.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; ANDRADE, N. J.; PIRES, A. C. S.; FERREIRA, S. O. Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of *Salmonella* Enteritidis. **Food Control**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 157–161, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.039>>

LIN, CHIA-MIN, MOON SARAH, DOYLE MICHAEL, M. K. Inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 65, n. 8, p. 1215–1220, 2016.

LINDEN, I. Van Der; AVALOS, K. R.; ERIKSSON, M.; VOS, W. H. De; DAMME, E. J. M. Van; UYTENDAELE, M.; DEVLIEGHERE, F. Minimal processing of iceberg lettuce has no substantial influence on the survival, attachment and internalization of *E. coli* O157 and *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 238, p. 40–49, 2016.

- LUO, Y.; ZHOU, B.; VAN HAUTE, S.; NOU, X.; ZHANG, B.; TENG, Z.; TURNER, E. R.; WANG, Q.; MILLNER, P. D. Association between bacterial survival and free chlorine concentration during commercial fresh-cut produce wash operation. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 70, 2018.
- MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. da S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 475–481, 2010.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., & PARKER, J. (2002). **Food preservation and foodborne microbial diseases**. In: M. T. MADIGAN, J. M. MARTINKO, & J. PARKER, *Brock biology of microorganisms* (10 ed., p. 953). Upper Saddle River, New Jersey, USA: Pearson Education.
- MALORNY, B.; HUEHN, S.; DIECKMANN, R.; KRÄMER, N.; HELMUTH, R. Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 81–95, 2009.
- MACHADO, C. M. M.; LYRA, G. R.; SILVA, E. M. M.; SÃO JOSÉ, J. F. B. Sanitization protocols applied to commercial restaurants: Effects on natural contaminant microbiota and *Salmonella enterica* Enteritidis adhered on tomatoes. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 11, n. 46, p. 1649–1656, 2017. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/3F4D74C67083>>
- MARQUES, F. P. P.; SPINOSA, W.; FERNANDES, K. F.; CASTRO, C. F. de S.; CALIARI, M. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 30, p. 119–126, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612010000500019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000500019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>
- MEIRELES, A.; GIAOURIS, E.; SIMÕES, M. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. **FRIN**, [s. l.], v. 82, p. 71–85, 2016.
- NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, A. K. C. Effects of Different Disinfection Treatments on the Natural Microbiota of Lettuce. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 66, n. 9, p. 1697–1700, 2003.
- NASTOU, A.; RHOADES, J.; SMIRNIOTIS, P.; MAKRI, I.; KONTOMINAS, M.; LIKOTRAFITI, E. Efficacy of household washing treatments for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 247–253, 2012.
- NEAL, J. A.; MARQUEZ-GONZALEZ, M.; CABRERA-DIAZ, E.; LUCIA, L. M.; O'BRIAN, C. A.; GRANDALL, P. G.; RICKE, S. C.; CASTILLO, A. Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 1123–1128, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.011>>.

- NGNITCHO, P. F. K.; KHAN, I.; TANGO, C. N.; HUSSAIN, M. S.; OH, D. H. Inactivation of bacterial pathogens on lettuce, sprouts, and spinach using hurdle technology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 43, n. July, p. 68–76, 2017.
- NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. February, p. 1–8, 2016.
- NTHENGE, A. K.; WEESE, J. S.; CARTER, M.; WEI, C.-I.; HUANG, T.-S. Efficacy of gamma radiation and aqueous chlorine on *Escherichia coli* O157:H7 in hydroponically grown lettuce plants. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 748–52, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388070>>
- OLIIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.
- OLIVEIRA, A. B. A. De. Comparison of different washing and disinfection protocols used by food services in Southern Brazil for lettuce (*Lactuca sativa*). **Food and Nutrition Sciences**, [s. l.], v. 3, n. January, p. 28–33, 2012.
- ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 686–693, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>>
- PAINTER, J. A.; HOEKSTRA, R. M.; AYERS, T.; TAUXE, R. V.; BRADEN, C. R.; ANGULO, F. J.; GRIFFIN, P. M. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 407–415, 2013.
- PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRETT, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 2, n. s1, p. 161–173, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x>>
- PARK, K. M.; BAEK, M.; KIM, H. J.; KIM, S.; KOO, M. Susceptibility of foodborne pathogens isolated from fresh - cut products and organic vegetable to organic acids and sanitizers. **Journal of Food Hygiene and Safety**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 1229–1153, 2013.
- POIMENIDOU, S. V.; BIKOULI, V. C.; GARDELI, C.; MITSIS, C.; TARANTILIS, P. A.; NYCHAS, G. J.; SKANDAMIS, P. N. Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157: H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 220, p. 6–18, 2016.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

PRADO-SILVA, L.; CADAVEZ, V.; GONZALES-BARRON, U.; REZENDE, A. C. B. Meta-analysis of the effects of sanitizing treatments on *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* inactivation in fresh produce. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 23, p. 8008–8021, 2015.

RAMOS, B.; BRANDÃO, T. R. S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L. M. Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce. **Food Control**, [s. l.], v. 42, p. 38–42, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.029>>

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

RONAGHI, M.; BEAMER, S.; JACZYNSKI, J.; MATAK, K. E. A comparison of the bactericidal effectiveness of hydrochloric and acetic acid on *Staphylococcus aureus* in silver carp during a pH-shift protein recovery process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 239–243, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.043>>.

SAGONG, H.-G.; LEE, S.-Y.; CHANG, P.-S.; HEU, S.; RYU, S.; CHOI, Y.-J.; KANG, D.-H. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. **International Journal of Food Microbiology** v. 145, n. 1, p. 287–292, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.010>>.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; MEDEIROS, H. S.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J. Removal of *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* from green peppers and melons by ultrasound and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 9–13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.015>>.

SENGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella* typhimurium on carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 301–305, 2004.

SEO, K. H.; FRANK, J. F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 3–9, 1999.

SIVAPALASINGAM, S.; FRIEDMAN, C. R.; COHEN, L.; TAUXE, R. V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the united states, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 2342–2353, 2004. Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-67.10.2342>>

SONG, M.; BAI, Y.; XU, J.; CARTER, M. Q.; SHI, C.; SHI, X. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food

commodities in Shanghai. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 195, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.020>>

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>>

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2018. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2017**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso 18 jul 2018.

TRABULSI, L. R., TEIXEIRA, L. M., & BUERIS, V. (2005). *Staphylococcus aureus*. In: L. R. Trabulsi, & F. Alterthum, **Microbiologia** (pp. 175-182). São Paulo: Atheneu.

TORRIANI, S.; ORSI, C.; VESCOVO, M. Potential of *Lactobacillus casei*, culture permeate, and lactic acid to control microorganisms in ready-to-use vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 12, p. 1564–1567, 1997. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1997/00000060/00000012/art00016>>.

VELÁZQUEZ, L. del C.; BARBINI, N. B.; ESCUDERO, M. E.; ESTRADA, C. L.; GUZMÁN, A. M. S. De. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. **Food Control**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 262–268, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.012>>

VIJAYAKUMAR, C.; WOLF-HALL, C. E. Minimum bacteriostatic and bactericidal concentrations of household sanitizers for *Escherichia coli* strains in tryptic soy broth. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 19, p. 383–388, 2002.

ZABOT, S.; RUSCHEL, J.; MARCHESI, C. M.; ALFARO, A. T.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; HASHIMOTO, E. H. Ácidos orgânicos e compostos clorados para controle de *Salmonella* spp. em frangos. **Segurança alimentar e nutricional**, [s. l.], v. 25, n.1, p. 76-84, 2018.

ZHANG, S.; FARBER, J. M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 311–321, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002096900374>>.

YUK, H.; BARTZ, J. A.; SHNEIDER, K. R. The effectiveness of sanitizer treatments in inactivation of *Salmonella* spp. from bell pepper, cucumber, and strawberry. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 71, n. 3, p.95 - 99, 2006.

ZHOU, J.; MENG, Y.; WANG, M.; MEMON, M. S.; YANG, X. Surface roughness estimation by optimal tactile features for fruits and vegetables. **International Journal of Advanced Robotic Systems**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–8, 2017.

**ANEXOS**

## ANEXO A

Resultados da determinação da concentração inibitória e bactericida mínima dos ácidos orgânicos e fermentados acéticos, e do ensaio *checkerboard*

**Tabela 1** – Valores de CIM e CIF do ácido acético e ácido láctico em relação a diferentes cepas bacterianas.

Cepas bacterianas	CIM sozinho (%)*		CIM combinação (%)*		CIF*	Interação
	AA	AL	AA	AL		
<b><i>Escherichia coli</i></b> <b>(ATCC 25922)</b>	0,25	0,25	0,125	0,06	0,74	Aditismo
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> <b>(ATCC 13883)</b>	0,25	0,25	0,06	0,125	0,74	Aditismo
<b><i>Salmonella ser. Enteritidis</i></b> <b>(ATCC 13076)</b>	0,125	0,25	0,06	0,06	0,72	Aditismo
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> <b>(ATCC 25923)</b>	0,25	0,25	0,06	0,125	0,74	Aditismo
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b> <b>(ATCC 29212)</b>	0,25	0,25	0,06	0,125	0,74	Aditismo

CIM: Concentração inibitória mínima; CIF: Concentração inibitória fracionada; AA: ácido acético; AL: ácido láctico

\* Resultados obtidos em triplicata.

## ANEXO B

Resultados da determinação da concentração inibitória e bactericida mínima dos fermentados acéticos estudados

**Tabela 1** – Concentração inibitória e bactericida mínima dos fermentados acéticos em relação a diferentes cepas bacterianas

Cepas bacterianas	Fermentados acéticos			
	Maçã		Mel	
	CIM (g/L)*	CBM (g/L)*	CIM (g/L)*	CBM (g/L)*
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	5,0	10,0	5,0	10,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	5,0	10,0	5,0	10,0
<i>Salmonella ser. Enteritidis</i> (ATCC 13076)	5,0	10,0	5,0	10,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	5,0	10,0	5,0	10,0
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	5,0	10,0	5,0	10,0

CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima

\* Resultados obtidos em triplicata