



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

GIOVANNA CAVAGNARI DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE UM FERMENTADO ACÉTICO COMO
DESINFETANTE DE ALFACES (*LACTUCA SATIVA*)**

Londrina
2015

GIOVANNA CAVAGNARI DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE UM FERMENTADO ACÉTICO COMO
DESINFETANTE DE ALFACES (*LACTUCA SATIVA*)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira.

Co-orientador: Profa. Dra. Wilma Aparecida
Spinosa.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729a Souza, Giovanna Cavagnari de.
Avaliação de um fermentado acético como desinfetante de alfaces (*Lactuca sativa*)
/ Giovanna Cavagnari de Souza. – Londrina, 2015.
48 f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.

Coorientador: Wilma Aparecida Spinosa.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Vinagre – Teses. 2. Ácido acético – Teses. 3. *Lactuca sativa* – Teses. 4. Alface – Higiene – Teses. 5. Desinfecção e desinfetantes – Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Spinosa, Wilma Aparecida. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 661.73

GIOVANNA CAVAGNARI DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE UM FERMENTADO ACÉTICO COMO
DESINFETANTE DE ALFACES (*LACTUCA SATIVA*)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Luciana Bill Mikito Kottwitz
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof. Dra. Margarida Masami Yamaguchi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de junho de 2015.

*AOS MEUS PAIS, JOSÉ BORGES E EDNA MARIA E
MEU NAMORADO THIAGO MORENO*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof. Tereza Rocha, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela paciência e ensinamentos destinados a mim durante os dois anos.

A minha coorientadora, Prof. Wilma Spinosa, também pela paciência e ensinamentos no laboratório que me auxiliaram muito durante a parte prática, pelas conversas fora de hora e toda preocupação em relação ao trabalho e aos seus alunos.

Aos professores do Mestrado em Ciência de Alimentos por todo o conhecimento compartilhado comigo. Aos colegas que estudaram, sofreram, ajudaram e concluíram juntos mais uma etapa. Aos técnicos do laboratório que sempre estavam dispostos a ajudarem e a Sandra Resende por sempre nos lembrar de todos os prazos e a CAPES pela bolsa de estudos obtida.

Gostaria de agradecer também quem contribuiu para que eu pudesse concluir o mestrado, a empresa GULOSINA, que compreendeu a minha necessidade de crescimento profissional e me liberou das atividades. Aos funcionários e colegas de trabalho que também compreenderam e me apoiaram na decisão, muitas vezes carregando mais afazeres para suprir minha falta ou me auxiliando em algumas tarefas.

Aos meus pais, irmã, tios, avós, cunhados e sogros pelo incentivo diário, pela preocupação, pelas preces e pela paciência em momentos difíceis.

E em especial ao meu namorado, Thiago Moreno, pelo incentivo maior desde a inscrição no mestrado até o momento final, mais até do que eu mesma ele acreditou na minha capacidade e não me deixou desistir em nenhum momento, sempre me apoiando, estando junto nas horas difíceis e alegres, de tensão e alívio, só me resta agradecer, muito obrigada.

**“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”
(Ghandi)**

SOUZA, Giovanna Cavagnari de. Avaliação de um fermentado acético como desinfetante de alfaces (*Lactuca sativa*). 2015. 50 páginas. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual De Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A maioria dos protocolos de sanificação de hortaliças utiliza cloro, que apresenta vários efeitos adversos, como liberação de compostos cancerígenos e contaminação do meio ambiente. Uma alternativa para substituir o cloro seria o uso do ácido acético, devido à fácil disponibilidade na forma de vinagre e por não apresentar riscos à saúde humana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação do fermentado acético de álcool com 13% (m/v) de acidez total, expressa em ácido acético (vinagre triplo), para uso na sanificação de alfaces. A escolha do fermentado acético de álcool é justificada por este ser um produto de baixo preço e facilmente disponível no mercado brasileiro. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) para *Escherichia coli* do fermentado acético triplo 13% (m/v) foi de 0,25 e 1,5% de acidez total, respectivamente. Amostras de alface artificialmente contaminadas com suspensões de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL (6 log UFC/mL) de *E. coli* e amostras de alface com contaminação de origem foram lavadas com água e imersas em solução com 1,5% (m/v) de ácido acético a partir do fermentado acético triplo, por 15 minutos. Esse tempo foi eficiente para a redução significativa da contagem de *E. coli* nas amostras artificialmente contaminadas e na contagem de coliformes totais e de *E. coli* nas amostras com contaminação de origem. Nenhuma alteração visual das folhas de alface foi observada, indicando que a concentração de 1,5% (m/v) de acidez total pode ser utilizada na sanificação da hortaliça sem prejuízo à sua aparência.

Palavras-chave: Vinagre triplo. Vinagre de álcool. Vinagre de cereal. Ácido acético. Sanitização. Higienização. *Lactuca sativa*.

SOUZA, Giovanna Cavagnari de. Valuation of a Fermented Acetic as Lettuces (*LACTUCA Sativa*) Disinfectant. 2015. 50 páginas. Master's thesis in Food Science - State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Most vegetable sanitization protocols using chlorine, which has various adverse effects such as release of carcinogenic compounds and environmental contamination. An alternative to replace the chlorine would be the use of acetic acid, due to easy availability in the form of vinegar and pose no risk to human health. This study aimed to evaluate the action of vinegar alcohol with 13% (w/v) total acidity, expressed as acetic acid (vinegar triple), for use in sanitizing lettuces. The choice of vinegar alcohol is justified because it is a low-priced product and easily available in the Brazilian market. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for *Escherichia coli* triple vinegars 13% (w/v) was 0.25 and 1.5% total acidity, respectively. Lettuce samples spiked with suspensions of 1.0×10^6 CFU / ml (6 log CFU / mL) of *E. coli* and lettuce samples origin of contamination were washed with water and immersed in a solution containing 1.5% (w/v) acetic acid from acetic triple fermented for 15 minutes. This time was efficient for the significant reduction of *E. coli* counts in spiked samples and total coliforms and *E. coli* in samples with contamination source. No visual change of the lettuce leaves was observed, indicating that the concentration of 1.5% (w/v) total acidity can be used in the sanitization of vegetables without prejudice to their appearance.

Key words: Triple vinegar. Alcohol vinegar. Cereal vinegar. Acetic Acid. Sanitization. Sanitation. *Lactuca sativa*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das análises microbiológicas das alfaces contaminadas artificialmente com *E. coli* e higienizadas com ácido acético 1,5%..... 38

Tabela 2 – Contagem de coliformes totais em alfaces naturalmente contaminadas 42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVOS GERAIS	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 IMPORTÂNCIA DA DESINFECÇÃO DE HORTALIÇAS FOLHOSAS	15
3.2 DESINFECÇÃO DE HORTALIÇAS PELO CLORO E DERIVADOS	17
3.3 ÁCIDO ACÉTICO	19
3.4 CONTAGEM DE <i>E. COLI</i> UTILIZANDO COMO PADRÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 ALFACE CRESPA (<i>LACTUCA SATIVA</i>).....	23
4.2 ÁCIDO ACÉTICO	23
4.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE <i>E. COLI</i>	23
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FERMENTADO ACÉTICO EM RELAÇÃO À <i>E. COLI</i>	24
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DE FERMENTADO ACÉTICO EM RELAÇÃO A <i>E. COLI</i>	24
4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCEDIMENTO DE SANIFICAÇÃO COM O FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO DE FOLHAS DE ALFACE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS COM <i>E. COLI</i>	24
4.7 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCEDIMENTO DE SANIFICAÇÃO COM FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO DE AMOSTRAS DE ALFACES NATURALMENTE CONTAMINADAS.....	25
4.8 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL DO FERMENTADO ACÉTICO	25
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 ARTIGO: AÇÃO SANITIZANTE DE FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO (VINAGRE TRIPLO) SOBRE <i>E. COLI</i> EM ALFACE COM CONTAMINAÇÃO DE ORIGEM E COM CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL	27
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Toxinfecções de origem alimentar, causadas por bactérias patogênicas, continua a ser um problema de saúde pública. O controle dessas doenças e a oferta de produtos alimentícios inócuos têm sido uma preocupação constante, tanto dos órgãos de vigilância sanitária e epidemiológica governamentais, quanto da indústria de alimentos.

Surtos recentes em todo o mundo foram associados ao consumo de hortaliças cruas contaminadas (SEOW et al., 2012). Segundo a Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, as frutas e hortaliças foram responsáveis por aproximadamente 12,5% dos surtos de origem alimentar que ocorreram no Brasil entre 2000 e 2011. Os principais microrganismos patogênicos associados aos surtos que ocorreram no Brasil nesse período, foram *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2011).

A contaminação das hortaliças pode acontecer durante toda a cadeia de produção, ou seja, desde o cultivo até a manipulação anterior ao consumo. As etapas de lavagem e de desinfecção podem auxiliar na remoção ou eliminação de parte da carga microbiana presente nestes alimentos e são utilizados com o intuito de prevenir a transmissão de microrganismos patogênicos.

O número de surtos associados a frutas e hortaliças levantaram dúvidas sobre a eficácia dos procedimentos de desinfecção desses alimentos e alguns trabalhos foram realizados com a finalidade de avaliar a resistência de bactérias patogênicas aos princípios ativos mais comuns presentes nos desinfetantes, como o hipoclorito de sódio (SILVA et al., 2003; SANTOS et al., 2004; FERREIRA, 2009).

Os compostos clorados, por questões econômicas, geralmente são os mais utilizados para a desinfecção, embora a formação de trihalometanos, a partir desse sanitizante, é um inconveniente por serem cancerígenos. Alternativas de desinfecção, que possam substituir o cloro proporcionando benefícios de ordem econômica e de segurança do alimento, tem despertado interesse (KHORDAGUI; MANCY, 1983; SANTOS, 1989).

Uma alternativa para substituir o cloro na desinfecção de alimentos pode ser o uso do ácido acético devido à sua eficácia a frio e baixo risco de

toxicidade, além de não alterar o sabor e o odor dos alimentos (NASCIMENTO et al., 2003a). Ácido acético vem do latim “acetum”, que significa vinagre. É um líquido transparente, com cheiro forte e paladar azedo, que quando muito diluído em água tem sabor ácido. O vinagre pode ser obtido pela fermentação de mosto de frutas, de mel, de cereais ou de outros vegetais por *Acetobacter aceti*, devendo apresentar acidez volátil mínima 4% v/v (KRASIL'NIKOV et al., 1991; AMINIFARSHIDMEHR, 1996; ANDREWS et al., 2003; MAZZOLA et al. , 2003).

O ácido acético não apresenta os potenciais riscos do cloro em relação ao meio ambiente e à saúde humana. Além disso, apresenta vantagens por ser barato e poder ser utilizado como um simples desinfetante doméstico (AKBAS; OLMEZ, 2007). Além disso, vários benefícios do ácido acético podem ser destacados, tais como, o baixo valor calórico e o fato de que pessoas hipertensas podem utilizá-lo como substituto do sal (SCHMOELLER; BALBI, 2010).

A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça mais consumida no Brasil. É a sexta hortaliça de maior importância econômica e a oitava em termos de volume, sendo produzida em quase todo o território nacional (BIASI et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2006). Vários tipos de alface são comercializados no Brasil dentre elas estão à alface lisa, americana, romana crespa e a roxa (CONTI, 1994).

A alface é consumida crua o que aumenta o risco da transmissão de doenças (MADDEN, 1992). Sua contaminação pode ocorrer antes e após a colheita, através do contato com o solo, irrigação com água contaminada, transporte e mãos dos manipuladores (NASCIMENTO et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do vinagre triplo ou fermentado acético triplo na desinfecção de alfaces artificialmente contaminadas com *Escherichia coli* e de alfaces contaminadas naturalmente com coliformes totais e *E. coli*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

2.1.1 Testar um fermentado acético para ser usado na desinfecção de alfaces.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.2 Determinar a concentração bacteriostática mínima para *Escherichia coli* de fermentado acético triplo, vinagre de álcool comercial e vinagre de cereal comercial (arroz).

2.2.3 Testar a eficiência do fermentado acético triplo na desinfecção de alfaces artificialmente contaminadas com *Escherichia coli*.

2.2.4 Testar a eficiência do fermentado acético triplo na desinfecção de alfaces naturalmente contaminadas com coliformes totais e *Escherichia coli*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTÂNCIA DA DESINFECÇÃO DE HORTALIÇAS FOLHOSAS

A sanidade das hortaliças consumidas cruas é fator relevante à saúde porque podem veicular doenças quando as condições de cultivo não são adequadas (COSTA et al., 2012). Hortaliças folhosas, como alface, rúcula e almeirão, são cultivadas próximo ao solo e estão mais sujeitas à contaminação. As hortaliças folhosas apresentam uma quantidade considerável de estruturas, com arranjos densos de estômatos, nervuras, tricomas e outras microestruturas cuticulares, que não só tornam a lavagem difícil, mas proporcionam locais de ancoragem e abrigos para microrganismos (KEERATIPIBUL; PHEWPAN; LURSINSAP, 2011).

Estima-se que a ingestão de vegetais folhosos crus é responsável por 17% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) por ano nos Estados Unidos (AYERS et al., 2009). No Brasil, entre 2010 e 2011, foram notificados 2094 surtos de origem alimentar causados principalmente por derivados de leite, carne, ovos, cereais e hortaliças. Nesse período, as hortaliças ficaram em 12º lugar como veículo de transmissão de doença, *E. coli* em 4º lugar em relação aos agentes etiológicos e as residências em primeiro lugar entre os locais de ocorrência dos surtos (BRASIL, 2011).

A lavagem em água corrente potável das hortaliças pode reduzir em até 90% a carga microbiana dos vegetais, porém não é suficiente para manter a contaminação em níveis seguros, sendo essencial a aplicação de uma etapa de sanitização. Para tanto, devem ser utilizados sanitizantes que, além de eficazes, sejam também seguros do ponto de vista toxicológico, uma vez que para evitar riscos de contaminação, é recomendável que os alimentos sejam mantidos e consumidos sem enxágue subsequente (FRANK; TAKEUSHI, 1999).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define desinfecção como uma operação de redução, por método físico e ou agente químico, do número de microrganismos a um nível que não comprometa a segurança do alimento (BRASIL, 2004; BRASIL, 2003). O Codex Alimentarius utiliza a mesma definição, porém acrescenta que o processo de desinfecção além de não

comprometer a segurança, também não deve comprometer as características próprias do alimento (BRASIL, 2003; CODEX, 2006).

A definição para desinfecção de alimentos, como frutas e hortaliças frescas do “Food and Drug Administration” (FDA) é o tratamento do produto por um processo eficaz de destruição ou redução do número dos microrganismos patogênicos, sem afetar a qualidade ou segurança do produto para o consumidor (Food and Drug Administration, 1998).

O uso da água potável para lavar as frutas e hortaliças é apenas a primeira operação que deve ser feita antes do consumo desses produtos. Uma segunda etapa, como o uso do cloro livre, é normalmente utilizado para reduzir a contaminação microbiana, tornando o produto mais seguro (BRACKETT, 1992; CHERRY, 1999; BURNETT; BEUCHAT, 2002). A adequada higienização das hortaliças depende da solubilidade, concentração e tempo de exposição do sanificante, além da quantidade de microrganismos presente na matéria prima e da disponibilidade e treinamento do manipulador (MUNHOZ; PINTO; BIONDI, 2008).

Um agente desinfetante deve ter ação antimicrobiana para tornar o alimento seguro, porém nenhum efeito que prejudique a qualidade sensorial do alimento na concentração a ser utilizada. Efeitos como amolecimento de tecidos, alteração na cor ou sabor residual podem fazer a diferença quando avaliada a melhor técnica de higienização (ALLENDE, 2008).

O regulamento de substâncias que são usadas para reduzir a carga microbiana de frutas e vegetais frescas é complexo e em algumas áreas incerto. Em cada país, a legislação que regulamenta as soluções sanitizante é diferente (GIL et al., 2009; IFPA;PMA, 2001).

No Brasil, o hipoclorito de sódio é o único agente sanitizante que a ANVISA aprova para uso em serviços de alimentação (BRASIL, 2004) e também é o sanitizante mais utilizado no mundo por ser mais barato, de fácil manipulação e razoavelmente eficaz (BRASIL, 2014; OLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009). O cloro apresenta, entretanto alguns problemas, tais como, quando em contato com matéria orgânica, há formação de cloraminas orgânicas, as quais são prejudiciais a saúde devido ao seu potencial carcinogênico (McNEAL et al., 1995).

Ácido peracético é utilizado em vários países com sucesso em relação à ação sanitizante (BLOCK, 1991). Alguns outros sanitizantes como ozônio,

dióxido de cloro, e ácidos orgânicos como o ácido acético, estão sendo estudados como alternativa para o cloro (NASCIMENTO; SILVA; CATANOZI, 2003a; OLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009).

A padronização de métodos para determinar a eficiência dos desinfetantes em relação aos microrganismos patogênicos em frutas e hortaliças é essencial. Um monitoramento periódico da qualidade desses desinfetantes deve ser realizado porque marcas diferentes, embora possam ter o mesmo princípio ativo, podem apresentar eficiência diferente (SILVA et al., 2003).

3.2 DESINFECÇÃO DE HORTALIÇAS PELO CLORO E DERIVADOS

Ao longo de 30 anos o cloro e os derivados do cloro são comprovadamente eficientes e utilizados como desinfetantes para água e também para alimentos (SAPERS, 2001; GOMEZ-LÓPEZ et al., 2008). No comércio, pode ser encontrado o cloro líquido, os hipocloritos de sódio e de cálcio e as pastilhas de cloro efervescentes (dicloroisocianurato de sódio). Os sais de hipoclorito são os mais utilizados por serem eficientes na atividade antimicrobiana, terem completa dissolução em água e apresentarem baixo custo (BERBARI; PASCHOALINO; SILVEIRA, 2001; NASCIMENTO et al., 2003b).

O hipoclorito de sódio é eficaz em reduzir o número de bactérias, fungos, vírus e nematóides e, em água, origina hidróxido de sódio (NaOH) e ácido hipocloroso (HClO). O agente germicida é o ácido hipocloroso, que se dissocia em H^+ e no íon OCl^- (BACHELI, 2013). O mecanismo de ação do cloro sobre os microrganismos não é totalmente conhecido. A hipótese mais aceita é de que a morte da célula bacteriana é resultado da reação química do ácido hipocloroso com a enzima triosefosfato dihidrogenase, essencial na oxidação da glicose e, portanto, no metabolismo celular (funções respiratórias) (GREEN; STUMPF, 1946).

As concentrações recomendadas de cloro residual livre para a desinfecção de frutas e hortaliças varia de 50 a 200mg/L. Os tempos de contato preconizados também variam de um a até 30 minutos (PARISH et al., 2003; RUIZ et al., 2007; HUANG; CHEN, 2011).

No Brasil, diferentes Portarias e Resoluções foram publicadas com recomendações do uso do cloro na desinfecção de frutas e hortaliças. A Portaria

nº5/2013 do Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo, recomenda para desinfecção de hortifrutícolas utilizar 10 ml (1 colher de sopa) de água sanitária de uso geral a 2% - 2,5% em 1(um) litro de água. Ou ainda utilizar hipoclorito de sódio a 1% na diluição de 20 ml (2 colheres de sopa) para 1(um) litro de água, devendo o alimento permanecer imerso por quinze a trinta minutos, seguidos de enxágue final com água potável (SÃO PAULO, 1999).

A ANVISA em sua cartilha para Boas Práticas de Serviços de Alimentação recomenda a imersão por 10 minutos em solução preparada com 1 (uma) colher de sopa de um produto a base de cloro em 1 (um) litro de água (BRASIL, 2014).

A atividade antimicrobiana do cloro e derivados é diminuída com a presença de matéria orgânica na água de lavagem e também com o aumento do pH. Além de reduzir a atividade antimicrobiana, a matéria orgânica pode reagir com o cloro e formar subprodutos altamente tóxicos, chamados de trihalometanos (TAM). Esses subprodutos podem afetar a saúde e esse fato foi verificado no início da década de setenta durante o processo de cloração da água (RUIZ et al., 2007; KOMULAINEN, 2004). Outro fator negativo é que o cloro é uma substância corrosiva, que pode provocar irritações na pele e no trato respiratório (ALVARO et al., 2009).

No Brasil, o teor máximo permitido em água potável é de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de trihalometanos, a partir da promulgação da Portaria nº 518, de 25/03/2004 (MEYER, 1994). A formação de trihalometanos se dá pela reação que inicia com o contato do cloro ou seus derivados com materiais orgânicos e essa formação de subprodutos continua enquanto os reagentes estiverem presentes. Os trihalometanos mais encontrados são triclorometano, bromodiclorometano, dibromoclorometano e tribromometano e o mais facilmente detectável é o clorofórmio sendo que esse induz ao câncer de fígado, tireoide e rins em ratos e camundongos (MEYER, 1994). Alternativas para o controle dos trihalometanos seriam, a redução das concentrações dos precursores como o cloro, podendo utilizar novos métodos de desinfecção, e controlar a retirada dos trihalometanos já formados (BAZZOLI, 1993; KHORDAGUI, MANCY, 1983).

A indústria que produz cloro, mesmo após o alerta sobre a formação dos trihalometanos, tem ainda grande importância econômica devido a vários

fatores, dentre eles a grande quantidade de cloreto de sódio na natureza, o baixo custo de produção, o alto uso na indústria de defensivos agrícolas e farmacêutica e a sua utilização nos tratamentos de água como agente bactericida (ANDRADE; ZAPORSKI, 1994).

O uso de cloro também está associado a produção de grandes quantidades de efluentes, com elevados níveis de demanda biológica de oxigênio (DBO). Devido aos riscos ambientais e a saúde, o uso do cloro em produção orgânica, está proibido na Europa. Em alguns países, o uso do cloro tem sido vedado, mesmo para produtos convencionais, e existe uma tendência para eliminar o cloro dos processos de desinfecção (OLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009).

3.3 ÁCIDO ACÉTICO

Os ácidos orgânicos constituem a classe de conservante mais utilizada em alimentos. São compostos que inibem o crescimento tanto de bactérias quanto de fungos, além de existirem relatos sobre a inibição da germinação e da multiplicação de esporos bacterianos. Em solução, os ácidos ocorrem em equilíbrio entre os estados dissociado e não dissociado, em função do pH. Com a redução do pH, a concentração de ácidos não dissociados aumenta (BROW; BOOTH, 1991)

O pK é definido como o valor de pH no qual as concentrações das formas dissociada e não dissociada de um ácido são iguais. Assim, abaixo do pK, predomina a forma não dissociada, enquanto acima do pK, a forma dissociada é predominante. Os ácidos orgânicos são geralmente fracos, ou seja, tem baixo pK. Sua atividade antimicrobiana depende não apenas da concentração de íons H⁺, mas, também, do efeito inibitório do ácido não dissociado, que geralmente é hidrofóbico, o que favorece sua penetração através das membranas plasmáticas. Dentro da célula, em pH mais alto, a molécula se dissocia, liberando ânions e prótons que não podem atravessar de volta a membrana plasmática, ficando acumuladas na célula. Assim, o efeito antimicrobiano de ácidos fracos é, geralmente, favorecido por baixo pH, que favorece o estado não dissociado da molécula (BROW; BOOTH, 1991).

O uso de ácidos fracos para a inibição do crescimento microbiano se deve a propriedade lipofílica que esses ácidos possuem. Essa propriedade causa o

rompimento ou a penetração na membrana inibindo reações metabólicas, acidificando o interior da célula microbiana, causando sua morte (BOOTH; KROLL, 1989; THERON; LUES, 2009).

O uso de ácidos orgânicos para a desinfecção de vegetais pode vir a ser uma alternativa para a substituição do cloro devido aos potenciais perigos desse produto para o meio ambiente e a saúde humana.

O ácido acético ou ácido etanoico, é um ácido orgânico, que por apresentar o grupo funcional COOH é classificado como um ácido carboxílico. A sua fórmula empírica é $C_2H_4O_2$, e sua estrutura química é CH_3COOH (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002). Dentre os ácidos orgânicos, o ácido acético tem sido o mais utilizado como agente desinfetante de alimentos, principalmente os vegetais. Damodaran et al. (2010) reforçam a ideia de que a atividade antimicrobiana do ácido acético aumenta a medida que o pH diminui. O ácido acético apresenta pK no valor de 4,76 (LEHNINGER et al., 1995). Na forma pura, é um líquido com odor pungente, altamente corrosivo para metais. É usado na produção de outras substâncias químicas utilizadas em plásticos, corantes, inseticidas, produtos químicos para fotografias, borracha, vitaminas, antibióticos, hormônios e como aditivo para alimentos (CETESB, 2010).

Ácido acético é o principal ingrediente do vinagre cuja formulação consiste de aproximadamente 4% de ácido acético e 96% de água. O seu nome deriva do latim *acetum*, que significa azedo, e é utilizado há muito tempo como condimento, dando sabores especiais aos pratos e também como conservante, prolongando a vida de prateleira dos alimentos. É produzido pela oxidação aeróbica de álcoois por espécies do gênero *Acetobacter* que transformam o álcool em ácido acético (SHREVE; BRINK, 1980).

Florentino et al. (2001) destacam que no Brasil o vinagre (ácido acético) não tem o reconhecimento que deveria quanto as suas propriedades sensoriais, nutritivas, sanitizantes e medicinais. O vinagre deveria ser mais indicado como sanitizante por ser barato e de uso simples em domicílios (PARISH et al. 2003). Outra característica favorável do ácido acético é o de ser naturalmente encontrado numa variedade de frutas e produtos fermentados e reconhecido como seguro (GRAS) (DICKSON, 1992; IZAT et al., 1989).

Propriedades antimicrobianas de ácido acético foram mostradas na

inativação de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos (BELL et al., 1997). Uma redução de mais de 7 ciclos logarítmicos na contagem de *Yersinia enterocolitica* foi observada em salsinha após a lavagem com 2 % de ácido acético por 15 min. A atividade antimicrobiana do ácido acético e do vinagre em relação a *Y. enterocolitica* depende do inóculo e do tempo de tratamento (KARAPINAR; GONUL, 1992).

Chang e Fang (2007) relataram que o ácido acético a 5 % reduziu 3 log a contagem de *E. coli* O157:H7 em alface, no entanto essa concentração de ácido acético prejudicou as características sensoriais do produto devido ao aparecimento de um sabor azedo inaceitável. Wu et al. (2000) relataram a redução de 6 log na contagem de *Shigella sonnei* após o tratamento de salsinha com ácido acético 5%. Esse tratamento, no entanto, levou a uma descoloração visível e a um forte odor de vinagre.

Huang e Chen (2011) constaram que a contagem de *E. coli* O157:H7 em espinafre artificialmente contaminado diminuiu significativamente ($p < 0,05$) após a lavagem com ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio em comparação à lavagem com água clorada a 200 ppm. Esses autores observaram que a atividade antimicrobiana de soluções de ácidos orgânicos ocorre, principalmente, durante os dois primeiros minutos de exposição e que concentrações superiores a 1% de ácido acético pode influenciar a qualidade sensorial das amostras.

3.4 CONTAGEM DE *ESCHERICHIA COLI* UTILIZADA COMO PADRÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIO

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 inclui cerca de 20 espécies, algumas originárias do trato gastrintestinal e outras não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*. 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. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter freundii*, apresentam esta característica de termotolerância. A presença de coliformes termotolerantes nos alimentos não indica necessariamente contaminação fecal, sendo a enumeração da

E. coli o melhor indicador conhecido, porque somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais. Diversos métodos disponíveis comercialmente permitem a enumeração específica e rápida de *E. coli* nos alimentos (SILVA et al., 2001b; FRANCO; LANDGRAF, 2003; SILVA et al., 2006).

Alguns isolados de *E. coli* têm a capacidade de causar doenças intestinais e são chamadas de *E. coli* diarreio gênicas. Atualmente, existem seis grupos enteropatogênicos: *E. coli* Enteropatogênica clássica (EPEC); *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de Aderência Difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004; XIA et al., 2010).

No Brasil, a Resolução RDC nº. 12/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano e determina 10^2 NMP/g como máxima contagem de coliformes a 45 °C para hortaliças, legumes e similares inteiros, selecionados ou não.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ALFACE CRESPA (*LACTUCA SATIVA*)

Trinta e sete pés de alface crespa (*Lactuca sativa*) foram adquiridos no comércio de Londrina, em diferentes semanas dos meses de outubro a dezembro de 2014. As mesmas foram coletadas aleatoriamente na gôndola de venda. As hortaliças eram comercializadas com a classificação de produto cultivado pelo método agrícola convencional.

4.2 FERMENTADO ACÉTICO

O fermentado acético triplo de álcool utilizado foi cedido pela empresa Tecnologia em Saúde, Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., localizada em Assis, São Paulo. O vinagre foi produzido por via biológica, através da fermentação de álcool. A acidez total em ácido acético era de 13 % (m/v) e pH 2,50.

O vinagre de álcool e o vinagre de cereal foram adquiridos no comércio da cidade de Londrina, Paraná. A acidez total em ácido acético dos produtos era de 4 % (m/v) e pH de 2,3 para vinagre de álcool e 2,6 para vinagre de cereal.

4.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE *E. COLI*

Cepas de *E. coli* ATCC 25922 foram inoculadas em BHI (Brain Heart Infusion) (BD) e incubadas por 24 horas a 35 ± 2 °C. Diluições seriadas foram realizadas em água peptonada 0,1% (Himedia) e plaqueadas em ágar MacConkey (Himedia) para a determinação da contagem bacteriana (log UFC/mL).

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FERMENTADO ACÉTICO EM RELAÇÃO À *E. COLI*

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fermentado acético triplo, fermentado acético de álcool e fermentado acético de cereal, para a *E. coli*, foi realizada utilizando a técnica de macrodiluição em tubos. Alíquotas de 100 µL de uma suspensão de *E. coli*, preparada conforme disposto no item 2.3, contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL, foram adicionadas aos tubos contendo caldo BHI e fermentado acético com concentrações finais totalizando 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0% de acidez total, para um volume final de 5 mL. Após 15 minutos, adicionaram-se 5 mL de caldo BHI (BD) em todos os tubos. Os tubos foram

incubados a 35 °C por 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo tubo com menor porcentagem de ácido acético, que não apresentou turbidez.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DE FERMENTADO ACÉTICO EM RELAÇÃO A *E. COLI*

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do fermentado acético para a *E. coli* foi realizada através da contagem em placas utilizando o meio sólido MacConkey. Após a determinação da CIM, alíquotas de 10 µL de cada tubo com diferentes concentrações de ácido acético foram inoculadas em placas contendo ágar MacConkey. Após 24 horas de incubação, foi considerada como CBM a menor concentração de ácido acético que inibiu completamente o crescimento de *E. coli*.

4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCEDIMENTO DE SANIFICAÇÃO COM O FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO DE FOLHAS DE ALFACE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS COM *E. COLI*

Seis pés de alface foram analisados individualmente, o que constituiu seis repetições do procedimento de sanificação. De cada pé de alface, as folhas externas e as internas (miolo) foram descartadas e duas porções distintas de 25 g de folhas foram pesadas. As duas porções, identificadas como A e B, foram contaminadas com 4 mL de uma suspensão de *E. coli* com aproximadamente 10⁶ UFC/mL. A suspensão foi distribuída de forma aleatória, com o uso de pipeta, por toda a superfície das folhas. Após secagem das folhas, de três a quatro horas, à temperatura ambiente, da porção A foi realizada a contagem de *E. coli*. As folhas da porção B foram imersas, por 15 minutos, em água contendo a solução com 1,5% (m/v) de ácido acético a partir do fermentado acético triplo, considerada a CBM. Em seguida, as folhas foram lavadas em água destilada estéril, centrifugadas em uma centrífuga própria para hortaliças folhosas e realizada a contagem de *E. coli*.

A contagem de *E. coli* foi realizada após a homogeneização das porções A e B (após sanificação) em 50 mL de água peptonada tamponada 0,1%. Diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁴ foram realizadas em água peptonada tamponada 0,1% e 100 µL de cada diluição foram semeados em ágar MacConkey, em duplicada. Após 24 horas de incubação a 35± 2 °C, foi realizada a contagem de colônias.

4.7 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCEDIMENTO DE SANIFICAÇÃO COM FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO DE AMOSTRAS DE ALFACES NATURALMENTE CONTAMINADAS

Trinta e um pés de alface adquiridos no comércio de Londrina foram analisados individualmente nesta etapa do trabalho. Três porções distintas de 25 gramas de folhas de cada pé de alface foram pesadas e identificadas como A, B e C. As porções B e C foram lavadas em água corrente clorada. A porção C foi imersa por 15 minutos em fermentado acético, com a concentração de 1,5 % (m/v) de acidez total. Em seguida, as folhas foram lavadas em água destilada estéril e centrifugadas em uma centrífuga própria para hortaliças folhosas. As contagens de coliformes totais e de *E. coli* foram realizadas das porções A, B e C, através da técnica de tubos múltiplos (NMP)⁵.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL DO FERMENTADO ACÉTICO

Em Erlenmeyer de 100 mL, foram colocados 1 mL do fermentado acético a ser analisado e 2 gotas da solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio a 0,1 M, até a viragem para vermelho. Cada mililitro da solução de hidróxido de sódio consumida corresponde a 0,6% de acidez, expressa em gramas de ácido acético ($H_3C-COOH$), por 100 mL de solução⁶.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As contagens de coliformes totais e de *E. coli* das amostras de alface artificialmente e naturalmente contaminadas foram convertidas em logaritmos decimais. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram utilizados para determinar se havia diferença significativa entre os tratamentos no nível de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontram-se na forma de artigo, que será submetido à publicação na Revista de Nutrição.

5.1 ARTIGO: AÇÃO SANITIZANTE DE FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO (VINAGRE TRIPLO) SOBRE *E. COLI* EM ALFACE COM CONTAMINAÇÃO DE ORIGEM E COM CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL.

Giovanna Cavagnari de Souza¹, Wilma Aparecida Spinosa¹, Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira¹,

I – Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 10011, CEP 86057-970, Londrina – PR. Correspondência para MOREIRA TC. Telefone (43) 33715968, e-mail: terezaoliveira@yahoo.com.

RESUMO

A maioria dos protocolos de sanificação de hortaliças utiliza cloro, que apresenta vários efeitos adversos, como liberação de compostos cancerígenos e contaminação do meio ambiente. Uma alternativa para substituir o cloro seria o uso do ácido acético, devido à fácil disponibilidade na forma de vinagre e por não apresentar riscos à saúde humana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação do fermentado acético de álcool com 13% (m/v) de acidez total, expressa em ácido acético (vinagre triplo), para uso na sanificação de alfaces. A escolha do fermentado acético de álcool é justificada por este ser um produto de baixo preço e facilmente disponível no mercado brasileiro. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) para *Escherichia coli* do fermentado acético triplo 13% (m/v) foi de 0,25 e 1,5% de acidez total, respectivamente. Amostras de alface artificialmente contaminadas com suspensões de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL (6 log UFC/mL) de *E. coli* e amostras de alface com contaminação de origem foram lavadas com água e imersas em solução com 1,5% (m/v) de ácido acético a partir do fermentado acético triplo, por 15 minutos. Esse tempo foi eficiente para a redução significativa da contagem de *E. coli* nas amostras artificialmente contaminadas e na contagem de coliformes totais e de *E. coli* nas amostras com contaminação de origem. Nenhuma alteração visual das folhas de alface foi observada, indicando que a concentração de 1,5% (m/v) de acidez total pode ser utilizada na sanificação da hortaliça sem prejuízo à sua aparência.

Palavras-chave: Vinagre triplo. Vinagre de álcool. Vinagre de cereal. Ácido acético. Sanitização. Higienização. *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

Most vegetable sanitization protocols using chlorine, which has various adverse effects such as release of carcinogenic compounds and environmental contamination. An alternative to replace the chlorine would be the use of acetic acid, due to easy availability in the form of vinegar and pose no risk to human health. This study aimed to evaluate the action of vinegar alcohol with 13% (w/v) total acidity, expressed as acetic acid (vinegar triple), for use in sanitizing lettuces. The choice of vinegar alcohol is justified because it is a low-priced product and easily available in the Brazilian market. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for *Escherichia coli* triple vinegars 13% (w/v) was 0.25 and 1.5% total acidity, respectively. Lettuce samples spiked with suspensions of 1.0×10^6 CFU / ml (6 log CFU / mL) of *E. coli* and lettuce samples origin of contamination were washed with water and immersed in a solution containing 1.5% (w/v) acetic acid from acetic triple fermented for 15 minutes. This time was efficient for the significant reduction of *E. coli* counts in spiked samples and total coliforms and *E. coli* in samples with contamination source. No visual change of the lettuce leaves was observed, indicating that the concentration of 1.5% (w/v) total acidity can be used in the sanitization of vegetables without prejudice to their appearance.

Key words: Triple vinegar. Alcohol vinegar. Cereal vinegar. Acetic Acid. Sanitization. Sanitation. *Lactuca sativa*.

1. INTRODUÇÃO

Doenças de origem alimentar continuam a ser um problema de saúde pública e a oferta de produtos alimentícios inócuos têm sido uma preocupação constante, tanto dos órgãos de vigilância sanitária e epidemiológica governamentais, quanto da indústria de alimentos.

A alface (*Lactuca sativa*) é uma das hortaliças mais consumidas em saladas no Brasil. Os compostos clorados são os mais utilizados para a sanificação dessa hortaliça por questões econômicas e talvez por estarem inseridos em publicação editada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A formação de trihalometanos, a partir de sanitizantes clorados, no entanto, é um inconveniente por serem cancerígenos. Alternativas de sanificação que possam substituir o cloro despertam interesse, devido aos benefícios de ordem econômica e de segurança¹.

Uma alternativa para substituição do cloro na sanificação de alimentos pode ser o composto conhecido como fermentado acético obtido de fermentado alcoólico. O ácido acético é o principal componente do vinagre ou fermentado acético² e pode ser

produzido pela fermentação por *Acetobacter* spp de mosto de frutas, de mel, de cereais, de mistura hidroalcoólica ou de outros vegetais. Este produto apresenta como característica positiva o baixo risco de toxicidade, além de não alterar o sabor e o odor dos alimentos³.

O produto obtido da fermentação acética do fermentado alcoólico de mistura hidroalcoólica, originária do álcool etílico potável de origem agrícola, é classificado e denominado como fermentado acético de álcool ou vinagre de álcool. O fermentado acético de fermentado alcoólico que apresentar acidez volátil superior a doze gramas de ácido acético por cem mililitros do produto é classificado como triplo e denominado fermentado acético triplo ou vinagre triplo. Já o fermentado acético de fermentado alcoólico de um ou mais cereais é chamado de fermentado acético de cereal ou vinagre de cereal².

O Brasil tem um parque industrial com capacidade instalada suficiente para atender a demanda de produtos diversificados a base de fermentado acético. O fermentado acético triplo é comercializado no mercado brasileiro por \$ 0.15 /L (*FOB - Free On Boar*) Além destes fatores é oportuno lembrar que o impacto ambiental de unidade produtora de vinagre é baixo. O fermentado acético de álcool de cana de açúcar é um produto de baixo custo e facilmente disponível no mercado brasileiro⁴.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do vinagre triplo ou fermentado acético triplo na sanificação de alfaces artificialmente contaminadas com *Escherichia coli* e de alfaces com contaminação desde a origem por coliformes totais e *E. coli*, aplicando a técnica de macrodiluição para dosagem da CIM e CBM.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ALFACE CRESPA (*LACTUCA SATIVA*)

Trinta e sete pés de alface crespa (*Lactuca sativa*) foram adquiridos no comércio de Londrina, em diferentes semanas dos meses de outubro a dezembro de 2014. As mesmas foram coletadas aleatoriamente na gôndola de venda. As hortaliças eram comercializadas com a classificação de produto cultivado pelo método agrícola convencional.

2.2 FERMENTADO ACÉTICO

O fermentado acético triplo de álcool utilizado foi cedido pela empresa Tecnologia em Saúde, Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., localizada em Assis, São Paulo. O vinagre foi produzido por via biológica, através da fermentação de álcool. A acidez total em ácido acético era de 13 % (m/v) e pH 2,50.

O vinagre de álcool e o vinagre de cereal foram adquiridos no comércio da cidade de Londrina, Paraná. A acidez total em ácido acético dos produtos era de 4 % (m/v) e pH de 2,3 para vinagre de álcool e 2,6 para vinagre de cereal.

2.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE *E. COLI*

Cepas de *E. coli* ATCC 25922 foram inoculadas em BHI (Brain Heart Infusion) (BD) e incubadas por 24 horas a 35 ± 2 °C. Diluições seriadas foram realizadas em água peptonada 0,1% (Himedia) e plaqueadas em ágar MacConkey (Himedia) para a determinação da contagem bacteriana (log UFC/mL).

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FERMENTADO ACÉTICO EM RELAÇÃO À *E. COLI*

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fermentado acético triplo, fermentado acético de álcool e fermentado acético de cereal, para a *E. coli*, foi realizada utilizando a técnica de macrodiluição em tubos. Alíquotas de 100 µL de uma suspensão de *E. coli*, preparada conforme disposto no item 2.3, contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL, foram adicionadas aos tubos contendo caldo BHI e fermentado acético com concentrações finais totalizando 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0% de acidez total, para um volume final de 5 mL. Após 15 minutos, adicionaram-se 5 mL de caldo BHI (BD) em todos os tubos. Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo tubo com menor porcentagem de ácido acético, que não apresentou turbidez.

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DE FERMENTADO ACÉTICO EM RELAÇÃO A *E. COLI*

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do fermentado acético para a *E. coli* foi realizada através da contagem em placas utilizando o meio sólido MacConkey. Após a determinação da CIM, alíquotas de 10 µL de cada tubo com diferentes concentrações de ácido acético foram inoculadas em placas contendo ágar MacConkey. Após 24 horas de incubação, foi considerada como CBM a menor concentração de ácido acético que inibiu completamente o crescimento de *E. coli*.

2.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCEDIMENTO DE SANIFICAÇÃO COM O FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO DE FOLHAS DE ALFACE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS COM *E. COLI*

Seis pés de alface foram analisados individualmente, o que constituiu seis repetições do procedimento de sanificação. De cada pé de alface, as folhas externas e as internas (miolo) foram descartadas e duas porções distintas de 25 g de folhas foram pesadas. As duas porções, identificadas como A e B, foram contaminadas com 4 mL de

uma suspensão de *E. coli* com aproximadamente 10^6 UFC/mL. A suspensão foi distribuída de forma aleatória, com o uso de pipeta, por toda a superfície das folhas. Após secagem das folhas, de três a quatro horas, à temperatura ambiente, da porção A foi realizada a contagem de *E. coli*. As folhas da porção B foram imersas, por 15 minutos, em água contendo a solução com 1,5% (m/v) de ácido acético a partir do fermentado acético triplo, considerada a CBM. Em seguida, as folhas foram lavadas em água destilada estéril, centrifugadas em uma centrífuga própria para hortaliças folhosas e realizada a contagem de *E. coli*.

A contagem de *E. coli* foi realizada após a homogeneização das porções A e B (após sanificação) em 50 mL de água peptonada tamponada 0,1%. Diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-4} foram realizadas em água peptonada tamponada 0,1% e 100 μ L de cada diluição foram semeados em ágar MacConkey, em duplicada. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C, foi realizada a contagem de colônias.

2.7 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCEDIMENTO DE SANIFICAÇÃO COM FERMENTADO ACÉTICO TRIPLO DE AMOSTRAS DE ALFACES NATURALMENTE CONTAMINADAS

Trinta e um pés de alface adquiridos no comércio de Londrina foram analisados individualmente nesta etapa do trabalho. Três porções distintas de 25 gramas de folhas de cada pé de alface foram pesadas e identificadas como A, B e C. As porções B e C foram lavadas em água corrente clorada. A porção C foi imersa por 15 minutos em fermentado acético, com a concentração de 1,5 % (m/v) de acidez total. Em seguida, as folhas foram lavadas em água destilada estéril e centrifugadas em uma centrífuga própria para hortaliças folhosas. As contagens de coliformes totais e de *E. coli* foram realizadas das porções A, B e C, através da técnica de tubos múltiplos (NMP)⁵.

2.8 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL DO FERMENTADO ACÉTICO

Em Erlenmeyer de 100 mL, foram colocados 1 mL do fermentado acético a ser analisado e 2 gotas da solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio a 0,1 M, até a viragem para vermelho. Cada mililitro da solução de hidróxido de sódio consumida corresponde a 0,6% de acidez, expressa em gramas de ácido acético ($H_3C-COOH$), por 100 mL de solução⁶.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As contagens de coliformes totais e de *E. coli* das amostras de alface artificialmente e naturalmente contaminadas foram convertidas em logaritmos decimais. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram utilizados para determinar se havia diferença significativa entre os tratamentos no nível de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de fermentado acético triplo, vinagre de álcool e vinagre de cereal testadas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) foram de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 % (m/v) de acidez total expressa em ácido acético. A adição de 5 mL de caldo BHI, após 15 minutos de exposição do inóculo de *E. coli* as diferentes concentrações dos fermentados acéticos, foi essencial para a determinação adequada da CIM e da CBM. Sem a adição de caldo BHI, não foi possível recuperar as células de *E. coli*, independente da concentração dos fermentados acéticos testada. Esse procedimento, possivelmente por diluir o ácido acético, possibilitou a recuperação das células de *E. coli* vivas, porém injuriadas pela exposição por 15 minutos ao ácido acético. A CIM e CBM de todos os fermentados testados para *Escherichia coli* foram de 0,25% e 1,5% de acidez total, expressa em ácido acético, respectivamente.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da avaliação da eficiência da sanificação com a solução de 1,5% (m/v) de ácido acético a partir do fermentado acético triplo por 15 minutos à temperatura ambiente de folhas de alface artificialmente contaminadas com *E. coli*. A concentração de acidez acética no fermentado acético usado na sanificação foi de 1,5% (v/v) de ácido acético, equivalente à CBM. As reduções das contagens de *E. coli* variaram de 0,88 a 3,58 log UFC/g e foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Resultados das análises microbiológicas das alfaces contaminadas artificialmente com *E. coli* e sanificadas com a solução de 1,5% de ácido acético a partir do fermentado acético triplo.

Amostra	Contagem de <i>E. coli</i> na alface antes da sanificação*	Contagem de <i>E. coli</i> na alface após sanificação *	Redução da contagem de <i>E. coli</i> após sanitização*
1	2,99	2,11	0,88
2	3,00	0,60	2,40
3	3,04	0,78	2,26
4	3,36	0,00	3,36
5	3,36	0,78	2,58
6	3,88	0,30	3,58

*log de UFC/g

Dados reportados por Nascimento *et al.* (2003)³ foram próximos aos encontrados neste estudo. Os autores compararam a eficácia do ácido acético, cloro e ácido

peracético e recomendaram o uso do ácido acético a 2%, por 15 minutos de contato por imersão, para sanificação de alface.

Outros trabalhos também avaliaram a ação bactericida do ácido acético sobre *E. coli* em alface artificialmente contaminadas porém empregaram concentrações diferentes. Park *et al.* (2011)⁷ testaram a eficiência antimicrobiana de diferentes ácidos orgânicos e obtiveram redução de 1,57 log UFC/ g de *E. coli* com solução de 2% de ácido acético após 5 minutos de exposição, resultado próximo ao obtido por Akbas & Olmez (2007)⁸, que reduziram em 1,5 log UFC/g, após 2 minutos de exposição com solução de 1% de ácido acético. Vijayakumar & Wolf-Hall (2002)⁹ avaliaram vinagre de maçã, vinagre branco, água sanitária e suco de limão para a redução de *E. coli* em alface. O resultado mais eficaz foi o uso de vinagre branco com concentração de 1,9% de acidez total em ácido acético. A redução foi de 5 log após 5 minutos de imersão com agitação e de 10 minutos de imersão sem agitação.

Bjornsdottir *et al.* (2006)¹⁰ afirmaram que muitos fatores afetam a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos, tais como pH, concentração de ácido, espécies bacterianas e meio ambiente. Vários estudos foram realizados sobre a ação bactericida do ácido acético sobre outras bactérias patogênicas, outros tipos de hortaliças e concentrações diferentes de ácido acético utilizados neste trabalho. Reduções de até 1,4 log UFC/g de *Listeria monocytogenes* foram encontradas em alfaces ou saladas verdes artificialmente contaminadas sanificadas com soluções de ácido acético variando de 0,5% a 1%^{11,12,13,14}. Redução de 1,74 log de *Salmonella* foi obtida após sanificação de alfafa e alface com solução de 5% e 2% de ácido acético por 10 minutos, respectivamente^{7,15}. Eiroa e Porto (1996)¹⁶ observaram redução de 1 log na contagem de *Vibrio cholerae* após exposição em solução de ácido acético de 0,25%. Por outro lado, reduções de 7 log nas contagens de *Yersinia enterocolitica* foram encontradas por Karapinar e Gonul (1992)¹⁷ com ácido acético a 2%.

Autores que testaram concentrações de 5% de ácido acético para a sanificação de hortaliças tiveram problemas com as características sensoriais do produto^{18,19}. Os resultados satisfatórios obtidos no presente estudo com fermentado acético triplo 1,5% (m/v) são positivos do ponto de vista de aplicação do produto, porque quanto maior a concentração de ácido acético na solução sanitizante maior a probabilidade de alterações sensoriais nas hortaliças.

A maioria dos estudos sobre a eficácia de agentes sanitizantes para frutas e verduras foi realizada com produtos artificialmente contaminados. No presente trabalho, além da análise de amostras de alfaces artificialmente contaminadas com *E. coli*, alfaces naturalmente contaminadas adquiridas no comércio foram analisadas. Na tabela 2 estão os

resultados em log do NMP/g de coliformes totais obtidos nas amostras de alface analisadas. A legislação brasileira não estabelece limites para coliformes totais e a sua presença é natural nas hortaliças frescas devido ao tipo de cultivo. Barbari, Paschoalino e Silveira (2001)²⁰ afirmaram, no entanto, que contagem de coliformes totais nos alimentos acima de 105 UFC/g é considerada elevada, podendo ser utilizada como indicador de higiene. Todas as amostras analisadas neste trabalho estavam contaminadas com coliformes totais, porém nenhuma apresentou contagens superiores a 105 UFC/g, diferente de outros autores, que relataram altas contagens deste grupo de bactérias nas amostras^{21,22}.

Na tabela 2 estão os resultados da avaliação da eficiência do procedimento de sanificação das amostras de alface com a solução contendo 1,5% em ácido acético a partir do fermentado acético triplo. A média de redução foi de 2,15 log NMP/g de coliformes totais após sanitização das amostras com ácido acético a 1,5%. Essa redução foi mais eficiente ($p < 0,05$) do que a redução com a lavagem das alfaces apenas com água corrente clorada.

Outros autores também avaliaram soluções de ácido acético para sanitização de hortaliças naturalmente contaminadas. Oliveira *et al.* (2012)²³ encontraram uma redução de 2,09 log UFC/g de coliformes totais em alfaces com 0,8% de ácido acético. Nascimento (2003)³ utilizou 2% de ácido acético e obteve redução nas amostras de alface de 3,57 log UFC/g de aeróbios mesófilos. Fantuzzi *et al.* (2004)²⁴, após a sanitização de amostras de repolho por 10 minutos com ácido acético 1% a temperatura ambiente, obtiveram redução de aeróbios mesófilos de 1,8 log UFC/g.

Um total de 23 (74,2%) das 31 amostras de alface naturalmente contaminadas analisadas neste trabalho estava contaminado com *E. coli* antes da lavagem com água. Todas as contagens estavam abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira e variaram de 0,4 a 46 NMP/g. *E. coli* foi isolada após a higienização com água corrente clorada de nove das 23 amostras contaminadas, e em uma amostra, após higienização com a solução contendo 1,5% em ácido acético a partir do fermentado acético triplo.

Características inerentes ao vegetal devem ser levadas em consideração em estudos que objetivam o desempenho da sanificação com fermentado acético para a eliminação de patógenos. Extrapolar os resultados aqui apresentados para outros vegetais deve ser realizado com cautela. Isto porque se deve levar em consideração o microambiente em que as bactérias se encontram nas diferentes superfícies dos diferentes vegetais. Os processos de lavagem podem não ser tão eficientes quando existe a presença de fendas, fissuras e interstícios nas superfícies¹¹.

Tabela 2 – Contagem de coliformes totais em alfaces naturalmente contaminadas e reduções na contagem de coliformes totais após lavagem com água corrente clorada e lavagem com água clorada e sanificação com solução de 1,5% de ácido acético a partir do fermentado acético triplo.

Amostra	Contagem de coliformes totais na alface (log NMP/g)*	Redução da contagem após lavagem (log NMP/g)**	Redução da contagem de coliformes totais após lavagem e sanificação (log NMP/g)***
1	2,38	0,00	2,38
2	2,38	1,75	2,43
3	2,38	1,41	2,02
4	2,38	1,93	2,02
5	1,66	1,49	1,66
6	2,38	1,41	2,38
7	2,38	1,41	1,75
8	2,38	0,34	2,02
9	2,38	0,72	1,20
10	2,38	2,20	2,54
11	2,38	1,20	1,41
12	1,66	1,03	2,06
13	2,04	1,07	2,44
14	2,38	1,41	1,75
15	2,38	1,06	2,38
16	1,63	0,79	1,03
17	1,97	1,37	1,97
18	2,66	1,34	2,66
19	3,38	2,54	2,78
20	3,04	2,44	3,04
21	2,32	0,69	1,72
22	3,04	2,09	3,04
23	3,04	0,87	2,44
24	3,38	1,41	3,38
25	2,32	1,00	1,72
26	3,04	0,00	2,09
27	3,38	0,73	2,02
28	3,04	0,39	1,41
29	3,38	0,73	3,38
30	3,04	1,68	3,04
31	3,38	1,00	2,78

*Contagem de coliformes totais nas amostras de alface naturalmente contaminadas, adquiridas no comércio de Londrina.

**Redução da contagem de coliformes totais, após lavagem das folhas de alface com água corrente clorada.

***Redução da contagem de coliformes totais após lavagem das folhas de alface com água clorada e sanificação com fermentado acético triplo com concentração de 1,5% de acidez total.

3. CONCLUSÃO

As técnicas empregadas para a determinação da CIM e CBM de fermentado acético de álcool ou de cereal em relação à *E. coli* pode ser considerada robusta para este tipo de avaliação.

Fermentado acético de álcool ou de cereal com concentração de 0,25% e 1,5% de ácido acético tem ação bacteriostática (CIM) e bactericida CBM em relação à *E. coli* após período de contato de 15 minutos, na temperatura ambiente.

A lavagem das folhas de alface com água e a imersão em solução com 1,5% a partir do fermentado acético triplo, em temperatura ambiente, por 15 minutos, foram eficientes para a redução significativa da contagem de *E. coli* em amostras artificialmente contaminadas e da contagem de coliformes totais e de *E. coli* nas amostras com contaminação de origem.

A concentração de 1,5% de ácido acético empregado na sanificação parece não ter causado perigo à qualidade da alface.

REFERÊNCIAS

1. Khordagui HK, Mancy HK. Formation of trihalomethanes during disinfection of drinking water. *Water quality bulletin*. 1983; 8: 37-43
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa nº 6, de 3 de abril de 2012. Estabelece os padrões de identidade e qualidade e a classificação dos fermentados acéticos.
3. Nascimento MS, Silva N, Catanozi MPLM. Emprego de sanitizantes na desinfecção de vegetais. **Higiene Alimentar**. 2003; , n.112, p. 42-46,
4. ANAV - Associação Nacional das Indústrias de Vinagre. Disponível em:<<http://www.anav.com.br/>>. Acesso em novembro de 2015.
5. Silva N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 536p
6. Spinosa WA, Santos Júnior V, Galvan D, Fiorio JL, Gomez RJHC. 2015. Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice. *FoodSci. Technol. Campinas* 35, 196–201.

7. Park SH.; et al. Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, p, 293-298, 2011.
8. Akbas MY, Olmez H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 619-624, 2007.
9. Vijayakumar C, Wolf-Hall CE. Evaluation of household sanitizers for reducing levels of *Escherichia coli* on iceberg lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.1646-1650, 2002.
10. Bjornsdottir K, Breidit Jr F, Mcfeeters RF. Protective effect of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 72, p. 660-664, 2006.
11. Ramos B, et. al. Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce. **Food Control**, v. 42, p. 38-42, 2014.
12. Nastou A.; et. al. Efficacy of household washing treatmentst for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 247-253, 2012.
13. Samara A, Koutsoumanis KP. Effect of treating surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 degrees C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 1-7, 2009.
14. Porto E, Eiroa MNU. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Food and Environmental Sanitation**, n. 21, p. 282-286, 2006.
15. Weissinger WR, Beuchat LR. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate *Salmonella* on alfafa seed. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 6, p. 1475-1482, 2000.
16. Eiroa, MNU, Porto E. Influência de diferentes tipos de vinagre e do hipoclorito de sódio na sobrevivência de *Vibrio cholerae* em folhas de alface (*Lactuca sativa*) artificialmente contaminados. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 199-207, 1996.
17. Karapinar M, Gonul SA. Effects of sodium bicarbonate, vinegar, acetic and citric acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v.16, p. 343-347, 1992.
18. Chang JM, Fang TJ. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 24, p. 745-751, 2007.
19. Wu FM, Doyle MP, Beuchat LR, Wells JG, Mintz ED, Swaminathan B. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. **Journal of Food Protection**, v.63, p.568-572, 2000.
20. Berbari SAG, Paschoalino JE, Silveira NFA. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.197-201, 2001.

21. Cabrini K. et al. Pesquisa de coliformes totais e *E. coli* em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, SP, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p. 92-94, 2002.
22. Oliveira MLS, et al. Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará. **Higiene Alimentar**, v.20, n.143, p.96-101, 2006.
23. Oliveira M. et. al. Presence and survival of *E. coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 133-140, 2012.
24. Fantuzzi E, Puschmann R, Vanetti MCD. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 24, n.2, p. 207-2011, abr-jun. 2004.

3. CONCLUSÃO

A CIM e CBM foi de 0,25% e 1,5% de ácido acético, respectivamente, tanto para o fermentado acético como para os vinagres comerciais testados.

A lavagem das folhas de alface com água e a imersão em solução de ácido acético 1,5%, por 15 minutos, foram eficientes para a redução significativa da contagem de *E. coli* nas amostras artificialmente contaminadas e da contagem de coliformes totais e de *E. coli* nas amostras naturalmente contaminadas.

Nenhuma alteração visual das folhas de alface foi observada, indicando que a concentração de 1,5% de ácido acético pode ser utilizada na desinfecção dessa hortaliça.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R.; HARTLEY, A.D.; COX, L.J. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. **Food Microbiology**, v. 6, (p. 69-77, 1989.
- AKBAS MY, OLMEZ H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 619-624, 2007.
- ALLENDE, A.; et al. Role of comercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 155-163, 2008.
- ALVARO, J. E.; et al. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n.1, p.11-15, 2009.
- AMINIFARSHIDMEHR, N. The management of chronic suppurative otitis media with acid media solutions. **The American Journal of Otology**. v. 17, n. 1, p. 24-25, 1996.
- ANDRADE, J.E.P.; ZAPORSKI, J. A indústria de cloro-soda. **Revista do BNDES**, v.1, n.2, p.183-226, Rio de Janeiro, 1994.
- ANDREWS, K.; MOWLAVI, A.; MILNER, S. M. The treatment of alkaline burns of the skin by neutralization. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 111, n. 6, p. 1918-1921, 2003.
- ARAÚJO, G.F. et al. Eficácia *in vitro* do ácido acético em *Pseudomonas* spp. **Acta. Cir. Bras**, v. 10, n. 4, p. 201-203, 1995.
- AYERS, L. T.; WILLIAMS, I. T.; GRAY, S.; GRIFFIN, P. M. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 2006. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 58, n. 22, p. 609-615, 2009.
- BACHELLI, M.L.B.; AMARAL, R.D.A.; BENEDETTI, B.C. Alternative sanitization methods for minimally processed lettuce in comparison to sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n. 3, 2013.
- BAZZOLI, N. **O uso da desinfecção no combate à cólera**. Apostila da Fundação Nacional de Saúde — Coordenação Regional de Minas Gerais. Recife: FNS/Opas, 1993.
- BELL, K. Y.; CUTTER, C. N.; SUMMER, S. S. Reduction of foodborne microorganisms on beef carcass tissue using acetic acid, sodium bicarbonate and hydrogen peroxide spray washes. **Food Microbiology**, v.14, p. 439-448, 1997.
- BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.197-201, 2001.

- BEUCHAT, L. R. **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review.** Food Safety Unit. World Health Organization, Geneva. 1998. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/surfac_decon/en/>. Acesso em: 07 de fev. 2014.
- BIASI, L.A.; LIMA, M.R.; GABARDO, N.P.; SCHMID, M.L.; MARTHAUS, P.S.; ZAMBON, F.R.A. Competição de cultivares de alface na região metropolitana de Curitiba. **Horticultura Brasileira**, v.9, n.1, p.14-15, 1991.
- BJORNSDOTTIR, K.; BREIDIT Jr, F.; MCFEETERS, R.F. Protective effect of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 660-664, 2006.
- BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation.** 4^o ed. Philadelphia: Lea Febiger, p. 167-181, 1991.
- BOOTH, I. R.; KROLL, R. G. **The preservation of foods by low pH.** London, GB: Elsevier, p. 119-160, 1989.
- BRACKET, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, v. 55, n.10, p.808-814, 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/cartilha_gicra_final.pdf>. Acesso em 02 de fev. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 - **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Diário Oficial da União, 10 jan.2001. Seção 1, p. 45-87.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. Brasília: SVS, 2011.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf>.
- BRASIL. Resolução - RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União.** Brasília, 23 de outubro de 2003.
- BRASIL. Resolução RDC nº 216/2004 item 4.1.7, Decreto nº 5.711/2002, art. 369 inciso III. Dispões sobre a Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União.** Poder Executivo, de 16 de setembro de 2004.
- BROWN, M. H.; BOOTH, I. R. Acidulants and low pH. **Food preservatives.** New york: AVI, 1991. p. 22-43.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1–17, 1999.

BUCHANAN, R.L. Influence of acidulant identify on the effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiol**, v. 21, p. 51–57, 2004.

BURNETT, S. L.; BEAUCHAT, L. R. Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total *Escherichia coli* O157:H7 cells in suspensions and on apples using confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers. **International of Journal Food Microbiology**, v.74, p.37-45, 2002.

CABRINI, K. et al. Pesquisa de coliformes totais e *E. coli* em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, SP, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p. 92-94, 2002.

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**, v. 24, p. 745-751, 2007.

CHERRY, J. P. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. **Food Technology**, v. 53, 54 – 59, 1999.

CODEX ALIMENTARIUS. **Higiene dos alimentos, textos básicos**. 2006.

Disponível

em:<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/codex_alimentarius.pdf>.

Acesso em 10 fev. 2014.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). **Ácido acético**, Ficha de informação toxicológica. 2010. Disponível

em:<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/acido_acetico.pdf>.

Acesso em 03 fev. 2014.

CONTI, J.H. **Caracterização de cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) adaptadas aos cultivos de inverno e verão**. São Paulo. 107p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1994.

COSTA, E. A.; et al. Avaliação de alfaces e eficiência da sanitização. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 3, p. 387-392, 2012.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 900p, 2010.

DICKSON, J. S. Acetic acid action on beef tissue surfaces contaminated with *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Science**, v.57, p.297–301, 1992.

DOYLE, M.P. *E. coli*. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 236-282, 1989.

EIROA, M. N. U. PORTO, E. Influência de diferentes tipos de vinagre e do hipoclorito de sódio na sobrevivência de *Vibrio cholerae* em folhas de alface (*Lactuca sativa*) artificialmente contaminados. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 199-207, 1996.

ENTANI, E. *et al.* Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 6, n. 8, p. 953-959, 1998.

FANG, T.J.; HSUEH, Y.T. Effect of chelators, organic acid and storage temperature on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, using response surface methodology. **J. Food Drug Anal**, v. 8, p. 187–194, 2000.

FANG, T.S.; TSAI, H.C. Growth patterns os *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acid anda their combinations immobilized in calcium alginate gels. **Food Microbiol**, v. 20, p. 243-253, 2003.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 24, n.2, p. 207-211, abr-jun. 2014.

FERREIRA, E. A. M. **Avaliação de diferentes tratamentos de desinfecção de alface: uma abordagem química e toxicológica**. Dissertação (Mestrado em Alimentação coletiva) – Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Porto, 2009.

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALEHIRO, E. T. G. **Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental a sua presença em nosso cotidiano**. 2002. Disponível em:<<http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarConceito.php?idConceito=14&alterarIdioma=sim&novoldioma=pt>>. Acesso em 03 de fev. 2014.

FLORENTINO, E. R.; et al. Avaliação das principais características de vinagres comerciais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 119, p. 36-39, 2001.

FONTANA N. **Atividade antimicrobiana de desinfectantes utilizados na sanitização de alface**. Dissertação. Santa Maria: Faculdade de nutrição, Universidade Federal de Santa Maria; 2006.

Food and Drug Administration (FDA). **Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables**. Center for Food Safety and Applied Nutrition, College Park, MD, USA, 1998.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Editora Atheneu, 2003. 182 p.

FRANK, J. F.; TAKEUSHI, K. Direct observation of *E. coli* O157:H7 inactivation on lettuce leaf using confocal scanning laser microscopy. In: **Proceedings of International Conference of International Committee on Food Microbiology and Hygiene**, Veldhoven. p.795-7, 1999.

GIL, M. L.; SELMA, V.; LOPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.134, p. 37-45, 2009.

GOMEZ-LOPEZ, V. M.; RAGAERT, P.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Shelf-life of minimally processed lettuce and cabbage treated with gaseous chlorine dioxide and cysteine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 74-83, 2008.

GREEN, D. E.; STUMPF, P. K. A note on the enzymatic method of estimating chlorine. **Journal of American Waterworks Association**, 1946.

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.

IFPA (International Fresh-cut Produce Association) and PMA (The Produce Marketing Association). **Handling guidelines for the fresh-cut produce industry**. Alexandria, VA:IFPA, p.5, 2001.

IZAT, A. L.; COLBERG, M.; ADAMS, M. H.; REIBER, M. A.; WALDROUP, P.W. Production and processing studies to reduce the incidence of Salmonellae on commercial broilers. **Journal of Food Protection**, v.52, p.670–673, 1989.

JIMENEZ, S.M.; et. al. Predictive model for reduction of *Escherichia coli* during acetic acid decontamination of chicken skin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 829-835, 2005.

KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARAPINAR, M.; GONUL, S. A. Effects of sodium bicarbonate, vinegar, acetic and citric acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.16, p. 343-347, 1992.

KEERATIPIBUL, S.; PHEWPAN, A.; LURSINSAP, C. Prediction of coliforms and *Escherichia coli* on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using Artificial Neural Networks. **Food Science and Technology**, v.44, p. 130-138, 2011.

KHORDAGUI, H. K.; MANCY, H. K. Formation of trihalomethanes during disinfection of drinking water. **Water quality bulletin**, v. 8, p. 37-43. 1983.

KOMULAINEN, H. Experimental cancer studies of chlorinated by-products. **Toxicology**, v.48, p.198-239, 2004.

KRASIL'NIKOV, A. P.; ADARCHENKO, A. A.; BULAI, P. I.; SOBESHCHUK, O. P. A comparative analysis of the antibacterial activity of antiseptics and antibiotics on samples of *Pseudomonas aeruginosa*. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii**. n. 8, p. 30-33, 1991.

LEHNINGER, A. L., et al. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo. Ed. Sarvier, 797p., 1995.

LEITÃO, M. F. *et al.* Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface. **Boletim do ITAL**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 201-226. 1981.

MADDEN, J. M. Microbial pathogens in fresh produce the regulatory perspective. **Journal of Food Protection** 55, 821–823, 1992

MAZZOLA, P. G.; MARTINS, A. M. S.; PENNA, T. C. V. Determination of decimal reduction time (D-value) of chemical agents used in hospital disinfection. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 33-34, 2003.

McNEAL, T. P.; HOLLIFIELD, H. C.; DIACHENKO, G. W. Survey of trihalomethanes and other volatic chemical contaminants in processed foods by purge-and-trape capillary gas chromatography with mass selective detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 78, n. 2, p. 391-397, 1995.

MCWATTERS, K. H. *et al.* Consumer acceptance of raw apples treated with an antibacterial solution designed for home use. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.106-110, 2002.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 10, n. 1, Mar. 1994. Disponível em:<http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1994000100011>. Acesso em 03 fev. 2014.

MUNHOZ, P. M.; PINTO, J. P. A. N.; BIONDI, G. F. Conhecimento sobre boas práticas por parte dos manipuladores de alimentos na rede municipal de ensino – Botucatu, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, n. 166/167, p. 29-31, 2008.

NASCIMENTO, A. R. *Et al.* Incidência de *Escherichia coli* e *Salmonella* em alface (*Lactuca sativa*). **Higiene Alimentar**, v.19, n.128, p.121-124, 2005.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M.P.L.M. Emprego de sanitizantes na desinfecção de vegetais. **Higiene Alimentar**, v. 17, n.112, p. 42-46, 2003a.

NASCIMENTO, M.S.; SILVA, N.; CATANOZI, M.P.L.M.; SILVA, K.C. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 113, 2003b.

NASCIMENTO, M.S.; SILVA, N.; OKAZAKI, M.M. Avaliação comparativa da eficácia de cloro, vinagre, ácido acético e ácido peracético na redução da população de microorganismos aeróbios mesófilos em verduras e frutas. **Revista Net-DTA Online**, v. 3, n. 6, 2003c

NASTOU, A.; *et. al.* Efficacy of household washing treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 247-253, 2012.

NETO, N.J.G. **Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) obtidas em cultivos tradicional, orgânico e hidropônico**. 2011. Dissertação (Pós Graduação) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

OLIVEIRA, M. et. al. Presence and survival of *E. coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 133-140, 2012.

OLIVEIRA, Maria de Lourdes Soares et al. Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará. **Higiene Alimentar**, v.20, n.143, p.96-101, 2006.

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

PARISH, M. E.; et al. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, 2003.

PARK, S.H.; et al. Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, p, 293-298, 2011.

PAULA, C.M.D. **Avaliação da resistência térmica, ácida e a desinfetantes de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 isoladas no sul do Brasil**. 2014 Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PORTO, E.; EIROA, M.N.U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Food and Environmental Sanitation**, n. 21, p. 282-286, 2006.

RAMOS, B.; et. al. Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce. **Food Control**, v. 42, p. 38-42, 2014.

RAY, B.; SANDINE, W.E. Acetic, propionic and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. **In Food Biopreservatives and Microbial Origin**, p 103-136, 1992.

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

RYU, J.H. DENG, Y., BEUCHANT, L.R. Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposure to reduce pH achieved with various organic acids. **J. Food Prot**, v. 65, p. 451-455, 1999.

SAKHARE, P.Z. et al. Efficacy of intermittent decontamination treatments during processing in reducing the microbial load on broiler chicken carcass. **Food Control**. v. 10, p. 189–194, 1999.

SAMARA, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Effect of treating surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 degrees C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 1-7, 2009.

SANTOS, C.L. **O Controle de Trihalometanos (THM) nas Águas de Abastecimento Público**. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1989.

SANTOS, T. B. A.; et al. Condições higiênico-sanitárias de alfaces antes e após tratamento com agente antibacteriano. **Higiene Alimentar**, v.18, n.121, p.85- 89, jun. 2004.

SANTOS, Y.T.O. **Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador – BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli***. [Dissertação]. Salvador: Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia; 2007.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Portaria CVS-6, de 10 de março de 1999. **Dispõe sobre regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimento de alimentos**. Disponível em:<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/E_PT-CVS-06_100399.pdf>. Acesso em 30 jan. 2014.

SAPERS, G. M. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39(4), p.305-311, 2001.

SCHMOELLER, R. K.; BALBI, M. E. Caracterização e controle de qualidade de vinagres comercializados na região metropolitana de Curitiba. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.

SEGUN, 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**, v. 96, p. 301-305, 2004.

SEOW, J.; RÉKA, A.; LESLIE, P.; HYUN-GYUN, Y. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. **Food Control**, v. 25, p. 39-44, 2012.

SHREVE, R. N.; BRINK Jr., J. A. **Indústria de processos químicos**. 4° ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1980.

SILVA, A. et. al. Sanitização de carcaças de frango com soluções de ácidos orgânicos comerciais e suco de limão. **Revista Tecnologia de Carnes**, v. 3, p.19-26, 2001.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 295 p.

SILVA, N.; OKAZAKI, M.M.; SILVEIRA, N.F.A., YOKOYA, F. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, São Paulo, v.2, n.23, p.167-173, 2003.

THERON, M. M.; LUES, J. F. **Organic acids and food preservation**. Boca Raton: CRC Press, p. 117-149, 2009.

UTYAMA, I. K. A. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, dez. 2007. ISSN 1808-0804. Disponível em: <<http://revistas.jatai.ufg.br/index.php/REF/article/view/3054>>. Acesso em: 12 Mai. 2015.

VIJAYAKUMAR, C. WOLF-HALL, C.E. Evaluation of household sanitizers for reducing levels of *Escherichia coli* on iceberg lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.1646-1650, 2002.

WEISSINGER, W.R.; BEUCHAT, L.R. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate Salmonella on alfafa seed. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 6, p. 1475-1482, 2000.

WU, F. M.; DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; WELLS, J. G.; MINTZ, E. D.; SWAMINATHAN, B. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. **Journal of Food Protection**, v.63, p.568-572, 2000.

XIA, X, MENG, J. MCDERMOTT, P.F., AYERS, S., BLICKENSTAFF, K., TRAN, T., ABBOT, J., ZHEN, J., ZHAO, S. Presence and characterization of Shjiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1709-1717, 2010.