

EFICÁCIA MICROBIANA E PARASITÁRIA DE SANITIZANTES À BASE DE CLORO E ÁCIDO ACÉTICO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

E.F. Soares¹, G.R. Prado², J. de M. Silva³, V.A. Boff⁴

1- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Especialização em Gestão e Controle de Qualidade de Alimentos – CEP:

98005-145 – Cruz Alta – RS – Brasil, Telefone: (55) 3322-9563 – e-mail: soares.eveline@yahoo.com

2- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Especialização em Gestão e Controle de Qualidade de Alimentos – CEP:

98005-145 – Cruz Alta – RS – Brasil, Telefone: (55) 3322-9563 – e-mail: geronimo-prado@uergs.edu.br

3- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Especialização em Gestão e Controle de Qualidade de Alimentos – CEP:

98005-145 – Cruz Alta – RS – Brasil, Telefone: (55) 3322-9563 – e-mail: juliana-silva@uergs.edu.br

4- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Especialização em Gestão e Controle de Qualidade de Alimentos – CEP:

98005-145 – Cruz Alta – RS – Brasil, Telefone: (55) 3322-9563 – e-mail: vilmar-boff@uergs.edu.br

RESUMO – Objetivou-se avaliar a eficácia antimicrobiana e parasitária dos sanitizantes à base de hipoclorito e ácido acético em alface e avaliar o tempo de exposição para eliminação destas populações. Cinco amostras foram coletadas no município de Cruz Alta, RS. As amostras foram divididas em três tratamentos: controle, hipoclorito de sódio e ácido acético preparados com uma diluição de 1:100 (1%) e em tempos de exposição de 5, 10, 15 e 20 minutos. Para avaliação parasitológica foi realizada análise do sedimento no microscópio óptico com aumento 10x e 40x. A redução da carga microbiana e parasitária para níveis aceitáveis comprovam a eficácia das soluções de hipoclorito (1% de cloro ativo) como agente sanitizante respeitado o tempo de 20 minutos de imersão das folhas. Também ficou demonstrada a redução do número de colônias e indivíduos parasitários na solução com ácido acético (vinagre), porém com eficácia inferior quando comparada ao hipoclorito de sódio.

ABSTRACT – The objective was to evaluate the antimicrobial and parasitic efficacy of sanitizers based on hypochlorite and acetic acid in lettuce and to evaluate the exposure time for elimination of these populations. Five samples were collected in the municipality of Cruz Alta, RS. The samples were divided into three treatments: control, sodium hypochlorite and acetic acid prepared with a dilution of 1:100 (1%) and at exposure times of 5, 10, 15 and 20 minutes. For parasitological evaluation, sediment analysis was performed under an optical microscope with 10x and 40x magnification. The reduction of the microbial and parasitic load to acceptable levels proves the effectiveness of hypochlorite solutions (1% active chlorine) as a sanitizing agent, respecting the time of 20 minutes of leaf immersion. It has also been shown to reduce the number of colonies and parasitic individuals in the solution with acetic acid (vinegar), but with lower efficacy when compared to sodium hypochlorite.

PALAVRAS-CHAVE: hipoclorito de sódio; ácido acético; carga microbiana; parasitas.

KEYWORDS: sodium hypochlorite; acetic acid; microbial charge; parasites.

1. INTRODUÇÃO

A lavagem dos vegetais é a prática mais comumente usada na obtenção de um produto mais seguro. É fundamental que a água seja de boa qualidade, contudo, a eficácia dos processos de lavagem pode ser aumentada quando utilizado soluções sanitizantes na água, reduzindo consideravelmente o número de microrganismos presentes nestes alimentos (Frank; Takeushi, 1999). A sanitização tem função significativa na minimização da deterioração e na conservação da qualidade do produto (Brackett; Splittstoesser, 1992). Portanto, o presente estudo



trouxe uma proposta de avaliar a eficácia antimicrobiana e parasitária dos sanitizantes hipoclorito e ácido acético em alface (*Lactuca sativa L.*) e avaliar o tempo de exposição destes agentes para eliminação destas populações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Avaliação da eficácia antimicrobiana dos sanitizantes em alface

Para avaliar a eficácia dos sanitizantes foram compradas cinco amostras (pé de alface) de variedade crespa em um supermercado no município de Cruz Alta/RS. As amostras em seu respectivo invólucro foram encaminhadas ao Laboratório da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, unidade em Cruz Alta.

No laboratório, todas as amostras foram retiradas da embalagem. Cada amostra de alface foi acondicionada em bandejas tamanho (40x60x8 cm). Nas bandejas, foi removido das amostras a matéria orgânica e solo residual das folhas e raízes. Para tal ação utilizou-se água destilada e esterilizada. Além disso, foram removidas as folhas que apresentavam deterioração e as partes impróprias para consumo.

Posteriormente, as folhas de cada pé de alface foram fragmentadas e 30 gramas foram pesadas, para cada amostra. As amostras foram subdivididas em quatro tempos diferentes: 5, 10, 15 e 20 minutos e acondicionadas em três soluções distintas, sendo: controle (amostra não higienizada), hipoclorito 1%, ácido acético 1%. A solução de hipoclorito de sódio foi preparada com uma proporção de 990 mL de água destilada estéril para 10 mL de hipoclorito de sódio em uma diluição de 1:100 (1%). A concentração de cloro ativo do produto comercial utilizado foi de 2,5%. A solução de lavagem com ácido acético foi preparada nas mesmas proporções. O vinagre comercial utilizado contava com teor de 4% de ácido acético. Todas as soluções foram preparadas em copos de béquer de vidro de 1000 mL.

2.2 Avaliação do tempo de exposição na eliminação da população microbiana das alfaves

As amostras de alface foram submersas em seus respectivos tratamentos sanitizantes em tempos de exposição de 5, 10, 15 e 20 minutos. Posterior ao tempo de exposição nos tratamentos, as folhas de alface foram retiradas dos copos de béquer. Um swab estéril fora friccionado nas folhas de alface e posteriormente semeado em placas de petri contendo Ágar Macconkey, através do método spread plated (Tortora et al., 2016). Para as análises dos microrganismos foram feitas as diluições das amostras, adicionando o volume de diluente água peptonada 0,1% para diluição inicial desejada, de 1:1, ou seja, 1,0 mL de diluente por grama de amostra, de forma que cada mililitro do lavado correspondesse a um grama de amostra. Após a semeadura em placa, estas foram acondicionadas em estufas a 36°C por 48 horas. Posteriormente, realizou-se a contagem das placas multiplicando o número de colônias pela diluição correspondente, obtendo-se unidades formadoras de colônias UFC por grama de alface (UFC/ g).

2.3 Avaliação da ação dos agentes sanitizantes na eliminação parasitária nas folhas de alface

A avaliação parasitária ocorreu conforme metodologia descrita em Nascimento (2014). Para a avaliação parasitológica retirou-se 200 mL da água de cada copo de béquer onde foram depositados 30 gramas de alface. As amostras numeradas de 1 a 5, aleatoriamente, foram avaliadas após 20 minutos de exposição na amostra controle, isto é, lavagem somente com água, e nas lavagens com os sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido acético. A água retirada foi filtrada com o auxílio de um tamis preparado com 4 dobras de gaze. Em seguida, mantida em repouso por 24h \pm 2, para sedimentação. Passado este período, o sobrenadante fora desprezado mantendo-se aproximadamente 24mL em cada cálice cônico, em seguida, esse volume foi fracionado em dois tubos cônicos tipo falcon, cada um contendo 12 mL. Após essa etapa, os conteúdos dos tubos foram centrifugados a 1015 g, durante 5 minutos, e um tubo foi usado para o método de Faust - método de Centrifugo Flutuação

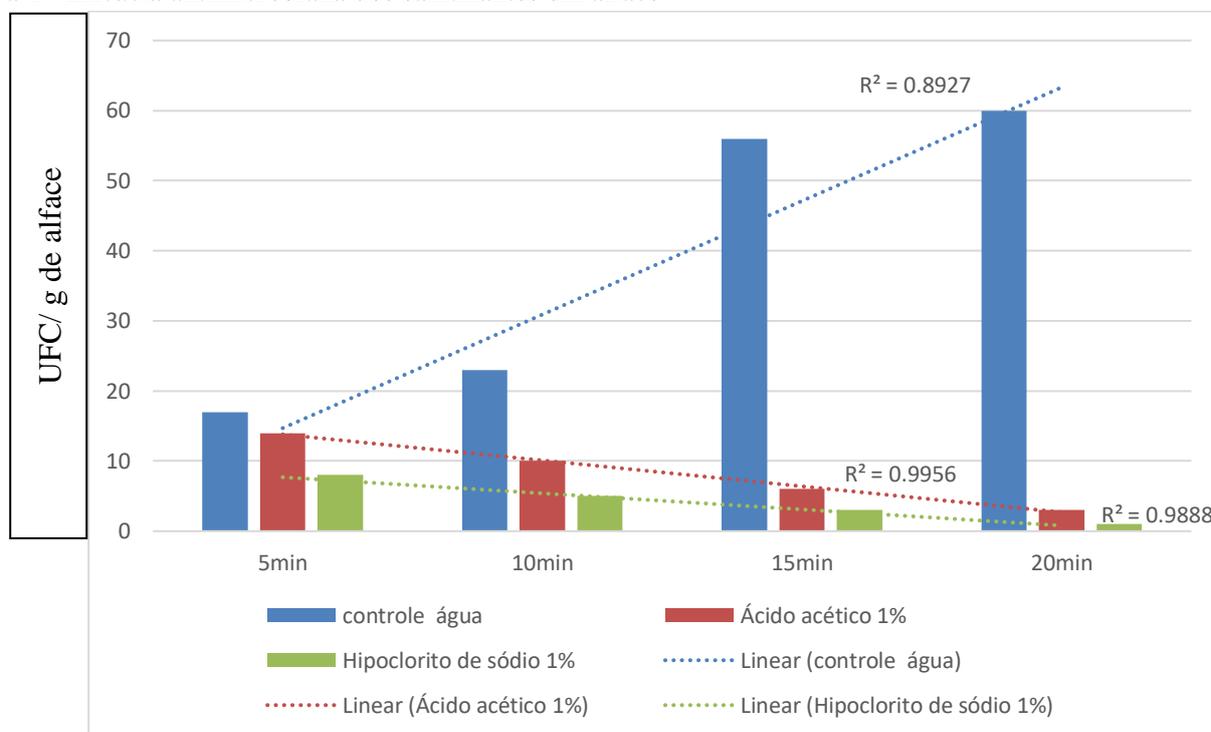
(Neves, 2000). E o outro para a o método de Hoffman, Pons e Janer - HPJ (Neves, 2000). Para o método de Faust, após a centrifugação inicial de 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante do tubo falcon e resuspendeu-se o precipitado com solução de sulfato de zinco a 33%, em seguida uma nova centrifugação foi realizada com mesma rotação durante 2 minutos, observando-se a formação de uma película sobrenadante. Tanto para o método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ), quanto para o método de Faust, pipetou-se 50 µL do precipitado, adicionando-o a uma lâmina, contendo igual volume de lugol a 0,5%, sobrepondo-a com uma lamínula e, em seguida, procedeu-se a análise das estruturas parasitárias em microscópio nas objetivas de 100x e 400x.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Avaliação da eficácia antimicrobiana dos sanitizantes em alface

Os resultados apontam uma diminuição do crescimento microbiano ao longo do tempo sob efeito dos sanitizantes ácido acético 1% e hipoclorito de sódio 1% que podem ser visualizados na Figura 1.

Figura 1 - Eficácia antimicrobiana dos sanitizantes em alface

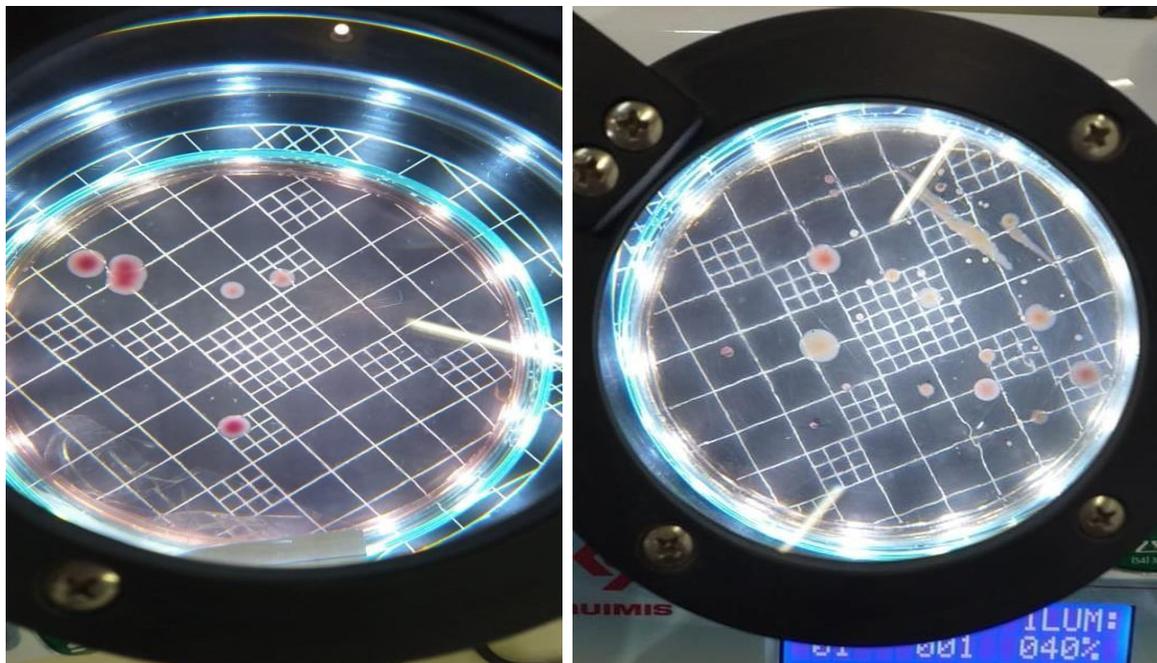


Fonte: Autores (2019)

Os resultados apontam que com o aumento do tempo (5, 10, 15, 20 min) houve uma elevação do crescimento microbiano no tratamento controle (somente água) conforme mostra a Figura 2. No entanto, observa-se diminuição do número de microrganismos em todos os tempos nos tratamentos com aplicação de ácido acético e hipoclorito de sódio. Após a utilização do hipoclorito de sódio percebeu-se que ao final de 20 minutos, restou apenas 1 (uma) unidade formadora de colônia (UFC/ folha de alface) na placa de petri. Conforme estudo de Ferreira et al. (2011) sobre a eficácia de sanitização de alface com hipoclorito de sódio, na faixa de 2 a 2,5%, por 15 min e posterior enxágue em água corrente, houve redução da carga microbiana quando comparada às amostras que não foram submetidas a nenhum processo de higienização. Nos resultados observados por Santos (2012), imergir as folhas de alface por 15 minutos em solução de água sanitária a 200 ppm de cloro foi suficiente para

reduzir significativamente ($p < 0,05$) a carga de bactérias heterotróficas, de coliformes termotolerantes e de *Escherichia coli*, o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho.

Figura 2 – Tratamento controle com 5 e 10 minutos de exposição



Fonte: Autores (2019)

Apesar do vinagre ser adotado como uma alternativa de baixo custo para a higienização de folhosas em restaurantes, os resultados do presente estudo não permitem recomendar este protocolo, visto que o tratamento onde foi aplicado o ácido acético mesmo com a redução de microrganismos ao longo do tempo, não garantiu a redução dessas populações até níveis satisfatórios, observando-se 4 (quatro) unidades formadoras de colônias ao final de 20 minutos de exposição da alface. Oliveira (2005) salienta que o vinagre em concentração mais elevada 20% tem permitido que porcentagens de redução mais próximas ao hipoclorito de sódio sejam alcançadas, porém, na presença de coliformes termotolerantes o vinagre não garante a redução total dessas populações. O Centro de Vigilância Sanitária ressalta com relação ao vinagre na sanitização de verduras cruas, que o mesmo é oficialmente registrado e avaliado laboratorialmente como “condimento” pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), não constando como produto sanitizante. Mesmo com essa avaliação, a acidez do vinagre age positivamente contra os microrganismos patogênicos (Brasil, 1993).

Embora não haja um padrão estabelecido para coliformes totais em hortaliças, os valores encontrados na amostra de alface (controle), ou seja, após lavagem, apenas em água, foi superior daquele encontrado na água de lavagem com vinagre e hipoclorito de sódio, um indicativo de que o procedimento de lavagem é prática ineficiente para a remoção segura de microrganismos presentes em hortaliças, e que do ponto de vista microbiológico é desaconselhável o consumo de alface apenas higienizada com água.

3.2 Avaliação da ação dos sanitizantes na eliminação de parasitas nas folhas de alface

São considerados parasitas em hortaliças os organismos provenientes principalmente de protozoários, nematoides e platelmintos. No presente trabalho focou-se na presença de nematoides nas amostras, entretanto, as espécies não foram identificadas. Apenas avaliou-se a presença e ausência destes organismos. A Tabela 1 mostra os resultados significativos da avaliação da eficiência dos sanitizantes em parasitas, que foram obtidos após 20 minutos de exposição.

Tabela 1 – Avaliação da eficiência dos sanitizantes em parasitas

Presença de Parasitas após exposição aos tratamentos			
“Pé de alface”	Controle água	Hipoclorito de Sódio 1%	Ácido acético 1%
	Número de indivíduos	Eficiência de redução em 20 min	
Amostra 1	6	100%	66%
Amostra 2	6	100%	50%
Amostra 3	5	100%	60%
Amostra 4	4	100%	75%
Amostra 5	4	100%	75%
Média	5	100%	65,2%

Fonte: Autores (2019)

A média de indivíduos observados nas amostras foi de 5 organismos. Observou-se a partir dos dados obtidos que o hipoclorito de sódio foi eficiente na eliminação de 100% dos indivíduos. Entretanto, quando fora aplicado ácido acético, verificou-se que a média de organismos eliminados foi 65,2%. A contaminação por nematoides em verduras é muito comum, principalmente naquelas desenvolvidas em sistema convencional de cultivo que é o solo.

A resistência ao ácido acético pode estar associada à fisiologia de alguns parasitas, associada a mecanismos de resistência, em função disso podem afetar decisivamente a ação antimicrobiana dos agentes sanitizantes.

Estudos realizados por Reis (2012) demonstram que, embora achados parasitas em sete amostras de hortaliças, a taxa de contaminação é pequena e satisfatória, mostrando que a maioria das hortaliças não apresenta contaminantes e não oferecem risco ao homem. Mesmo com a pequena taxa de contaminação, existe o risco de infecção quando as hortaliças com parasitas forem ingeridas. Por isso, existe a grande importância da boa higienização através da lavagem preconizada pelo Ministério da Saúde.

4. CONCLUSÃO

É possível concluir que a contagem de microrganismos na amostra controle, ou seja, depois da lavagem das folhas de alface com água, mostrou a necessidade e importância da sanitização, de forma a tornar o produto apto para consumo.

A redução da carga microbiana nas folhas de alface para níveis aceitáveis, constatada neste trabalho, comprovam a eficácia das soluções de água sanitária (1% de cloro ativo) como agente sanitizante de folhas de alface (*Lactuca sativa* L.), respeitado o tempo de 20 minutos de imersão das folhas. Também ficou demonstrada a redução do número de colônias, a níveis satisfatórios, tanto nas folhas de alface tratadas com solução clorada (água sanitária), quanto com solução com ácido acético (vinagre), todavia, com vantagem para a primeira. Contudo, a redução observada nas contagens microbianas não pode ser atribuída exclusivamente à atividade germicida do agente sanitizante, tendo que considerar que o efeito pode estar conjugado a uma remoção das células na lavagem inicial, sendo esta de boa qualidade.

Com relação à contaminação parasitária, o hipoclorito de sódio foi eficiente na eliminação de 100% dos indivíduos. Entretanto, quando aplicado ácido acético, observou-se que a média de organismos eliminados foi 65,2%. A eficácia do hipoclorito como sanitizante é comprovadamente discutida em trabalhos acadêmicos, no entanto, o uso do vinagre ainda precisa de mais estudos e fundamentação científica para ser utilizado como agente saneante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Brackett, R. E. & Splittstoesser, D. F. Fruits and vegetables. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. (1992). *Compendium for the Microbiological Examination of Foods*. Washington DC: American Public Health Association. 3rd ed.

Brasil. Ministério da Saúde (1993). *Parecer Técnico da coordenação dos laboratórios do Ministério da Saúde sobre uso de vinagre para desinfecção*. (Comunicado CVS 64 de 19/05/1993 - DOE de 20/05/1993). Secretária de Vigilância em Saúde. Centro de Vigilância Sanitária.

Ferreira, J. A.; Nenê, A. R. M.; Massulo A. O.; Salamoni, R. M.; Cardoso F. N. (2011). *Estudo preliminar da eficácia de sanitização de amostras de alface comercializadas em Campo Grande - MS*. (Anuário da Produção Acadêmica Docente).

Frank, J. F.; Takeushi K. (1999). Direct observation of *Escherichia coli* O157:H7 inactivation on lettuce leaf using confocal scanning laser microscopy. In: Tuijtelaars (eds) *Food Microbiology and Food safety into the next millenium*. Proceedings of 17th International Conference of International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH). Vindhoven. The Netherlands.

Nascimento, E. D.; Alencar, F. L. S. (2014). Antimicrobial and antiparasitic efficiency of disinfectants in the sanitation of vegetables in Natal city – RN. *Ciência e Natura, Santa Maria - RS. Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas*. Universidade Federal de Santa Maria. v. 36 n. 2 mai-ago. p. 92–106

Neves, D. P. (2000). *Parasitologia Humana*. São Paulo. Atheneu. 10.ed

Oliveira, A. B. A. (2005). *Comparação de diferentes protocolos de higienização de alface (Lactuca sativa) utilizados em restaurantes de Porto Alegre – RS*. Junho.

Reis, R. R. (2012). *Avaliação parasitológica de hortaliças comercializadas em feiras livres da cidade de Anápolis, Goiás*. Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz – IEPG.

Santos, H. S. (2012). Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*). *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo; 71(1):56-60.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. (2016). *Microbiologia*. 12° ed. p. 969.