

# Avaliação da eficiência antibacteriana de fermentados acéticos comerciais em saladas de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Duque de Caxias, Rio de Janeiro

## Evaluation of antibacterial efficiency of commercial acetic fermented in lettuce salad (*Lactuca sativa*) marketed in Duque de Caxias city, Rio de Janeiro

### RESUMO

Barbara Mazeto Saraiva<sup>1,\*</sup> 

Elaine de Castro Antunes

Marques Fernandez<sup>1</sup> 

Alfredo Tavares Fernandez<sup>II</sup> 

**Introdução:** A contaminação de alimentos consumidos crus, como salada de alface, é previsível pela origem telúrica e pela manipulação indevida nos estabelecimentos comerciais constituindo um possível risco à saúde pública. A utilização de fermentado acético como antibacteriano poderia ser um mecanismo hábil para melhorar a qualidade e a segurança desse alimento. **Objetivo:** Avaliar a qualidade microbiológica das saladas de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Duque de Caxias, RJ, e a efetividade do fermentado acético de maçã como descontaminante. **Método:** Foram coletadas amostras de saladas de alface em quatro restaurantes, que foram analisadas antes e após a descontaminação com fermentados acéticos em acidez voláteis (4, 5 e 6 em g. 100 mL<sup>-1</sup>) e concentrações de 10% e 50% quanto à contagem de bactérias aeróbicas mesófilas, coliformes totais e termotolerantes e quanto à presença de *Salmonella* spp. **Resultados:** As análises revelaram má qualidade das amostras em três restaurantes (A, B, C) nos quais, embora não tenha sido constatada a presença de *Salmonella* spp., verificou-se contagens elevadas de bactérias aeróbicas mesófilas e de coliformes totais e termotolerantes. De acordo com as normas legais, em dois estabelecimentos as amostras seriam reprovadas pelo excesso de coliformes termotolerantes. Com o uso do fermentado acético na descontaminação, houve redução das contagens bacterianas, permitindo que todas as amostras apresentassem condições satisfatórias para consumo humano. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com diferentes concentrações e acidez de fermentado acético em relação as amostras não tratadas. **Conclusões:** O fermentado acético pode ser uma alternativa segura e prática para melhorar a qualidade higiênico-sanitária da alface em saladas cruas, garantir a segurança alimentar e reduzir os riscos à saúde humana.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Lactuca sativa*; Ácido Acético; Análise Microbiológica; Descontaminação; Segurança Alimentar

### ABSTRACT

**Introduction:** Contamination of raw consumed foods such as lettuce salads is predictable by telluric origin and improper handling in commercial establishments constituting a possible risk to Public Health. The use of acetic fermented as antibacterial could be a skillful mechanism to improve the quality and safety of this food. **Objective:** To evaluate the microbiological quality of lettuce (*Lactuca sativa*) salads marketed in the city of Duque de Caxias, RJ and the effectiveness of acetic acid lecithin as a decontaminant. **Method:** Lettuce salad samples were collected at four restaurants and analyzed before and after decontamination with acetic fermented in volatile acidity (4, 5 and 6 in g. 100 mL<sup>-1</sup>) and concentrations of 10% and 50% the count of mesophilic aerobic bacteria, total and thermotolerant coliforms and the presence of *Salmonella* spp. **Results:** The analyses revealed poor quality of the samples in three restaurants (A, B, C) where, although the presence of *Salmonella* spp. was not observed, there were high counts of mesophilic aerobic bacteria and total and thermotolerant coliforms. In accordance with legal regulations, in two establishments, the samples would be disapproved by the excess of thermotolerant coliforms. With the use of acetic fermentation in the decontamination, bacterial counts were reduced, allowing all the samples to present satisfactory conditions for human consumption. There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the treatments with different concentrations and acidity of acetic fermented in relation to the untreated samples. **Conclusions:** Acetic fermented can be a safe and practical alternative to improve the hygienic-sanitary quality of lettuce in raw salads, ensuring food safety and reducing risks to human health.

**KEYWORDS:** *Lactuca sativa*; Acetic Acid; Microbiological Analysis; Decontamination; Food Safety

<sup>1</sup> Universidade do Grande Rio (Unigranrio), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>II</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

\* E-mail: [altafe3@gmail.com](mailto:altafe3@gmail.com)

Recebido: 11 abr 2019

Aprovado: 08 jul 2019



## INTRODUÇÃO

O consumo de folhas verdes como a alface (*Lactuca sativa*) vem crescendo devido aos benefícios nutricionais e à conveniência, já que são alimentos *ready-to-eat* (RTE), ou seja, já prontos para consumo<sup>1,2</sup>.

Behrens et al.<sup>3</sup> observaram entre consumidores que esses alimentos, embora convenientes pela economia de tempo, levantam suspeitas sobre integridade e segurança.

As saladas de alface são reconhecidas, por sua origem e manipulação, como um dos alimentos com maior taxa de contaminação por microrganismos diversos. O fermentado acético comercialmente mais conhecido como vinagre pode ser usado como ingrediente para contribuir com o sabor nas saladas, mas também é conhecido como uma substância segura (*Generally Recognized As Safe* - GRAS), podendo ser utilizado na descontaminação de vegetais.

Os vegetais consumidos crus são responsáveis por surtos de doenças de origem alimentar causados devido a bactérias como: *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, habitantes normais do solo, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp., presentes no trato intestinal de animais, incluindo seres humanos. Em geral, a contaminação de frutas e vegetais crus ocorre por meio do contato com fezes, esgoto ou água de irrigação não tratada<sup>4</sup>.

A alface crua, devido à alta taxa de contaminação, pode apresentar vários efeitos sobre a saúde humana, resultando em diarreia leve e autolimitante até grave com desidratação severa, perda de peso e anemia<sup>5</sup>.

Diversos estudos revelaram que numerosos surtos de doenças de origem alimentar estão relacionados ao consumo de alface contaminada principalmente por *E. coli* enterohemorrágica<sup>6,7,8,9</sup>, *Salmonella* spp.<sup>10,11</sup> e *Yersinia* spp.<sup>12,13</sup>.

Para o preparo desses vegetais, eles devem ser lavados com água potável para que a carga microbiana dos vegetais possa ser reduzida em 90%. Porém, isso pode não ser suficiente para eliminar a contaminação sendo essencial aplicar um plano de higienização<sup>14</sup>.

No Brasil, o cloro é o mais usado para a descontaminação de vegetais, particularmente o hipoclorito de sódio, devido ao pequeno custo. A recomendação de uso legal é de 200-250 ppm com contato mínimo de 15 min<sup>15</sup>.

Nos últimos anos, tem havido crescimento no consumo de frutas e vegetais minimamente processados. Entretanto, produtos químicos clorados usados como sanitizantes podem formar compostos carcinogênicos com impactos adversos à saúde humana, havendo necessidade de introdução de novos sanitizantes e tecnologias para garantir a segurança desses alimentos<sup>16</sup>.

O ácido acético tem sido estudado pela sua eficiência em remover patógenos de frutas e vegetais frescos. Foi evidenciado em

um estudo sobre a desinfecção de alface inoculada com *E. coli* O157:H7 ( $10^7$  UFCg<sup>-1</sup>) que um vinagre comercial de arroz com 5% de ácido acético (pH 3,0) por 5 min reduziu a população desse patógeno em três ciclos logarítmicos<sup>17</sup>.

O uso comercial de soluções ácidas orgânicas pode minimizar os riscos ao ambiente e a saúde pública<sup>18</sup>. Também existem vantagens no uso desses produtos já que são baratos, biodegradáveis e de fácil manuseio<sup>14</sup>. A utilização de ácidos orgânicos GRAS é reconhecida como segura embora a sua eficácia dependa do tipo de alimento em questão e varie de ácido orgânico para ácido orgânico<sup>19</sup>.

Na literatura existem numerosos estudos sobre a eficácia destes agentes em frutas e vegetais, mas a maioria foi conduzida em condições sob contaminações artificiais usando diferentes microrganismos e as condições técnicas de aplicação nem sempre são passíveis de comparação<sup>17,20,21,22,23,24,25</sup>

Esta pesquisa foi conduzida com o intuito de avaliar a qualidade de saladas de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes *self-service* e a eficácia da descontaminação através de fermentados acéticos com diferentes acidez e concentrações quanto à contagem de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes (totais e termotolerantes) e *Salmonella* spp.

## MÉTODO

### Obtenção das amostras

As amostras foram compostas de saladas de alface (*Lactuca sativa*) prontas para consumo e sem temperos, expostas em balcões *self-service* de quatro restaurantes escolhidos aleatoriamente e identificados como A, B, C e D; localizados na cidade de Duque de Caxias no estado do Rio de Janeiro. As amostras foram colhidas assepticamente em embalagens de papel cartão aluminizado na quantidade aproximada de 350 g, identificadas e transportadas ao laboratório de controle microbiológico de alimentos da Universidade do Grande Rio (Unigranrio), onde as análises foram conduzidas. Os fermentados acéticos de maçã utilizados nesse experimento foram adquiridos em estabelecimentos comerciais de acordo com sua acidez expressa na rotulagem.

### Tratamento das amostras

De cada amostra, 14 subamostras de 25 g foram obtidas, das quais sete foram usadas para realização das análises de contagem de bactérias aeróbias mesófilas viáveis, coliformes (totais e termotolerantes) e as outras sete foram usadas para pesquisa de *Salmonella* spp. Das 14 subamostras, duas foram analisadas em separado para avaliação da microbiota inicial, sem o tratamento com o fermentado acético; sendo essas duas definidas como controle. As 12 subamostras foram, então, submetidas a descontaminação com fermentado acético sob imersão por 15 min em diferentes proporções de acidez volátil (em g. 100mL<sup>-1</sup>) e diluídas



em água destilada esterilizada nas seguintes soluções: acidez 4 a 10% e 50%, acidez 5 a 10% e 50%; e acidez 6 a 10% e 50%.

#### Análise microbiológica

As análises foram conduzidas em triplicata para estimar: o número mais provável (NMP) de coliformes (totais e termotolerantes), a presença/ausência de *Salmonella* spp. e a contagem total de bactérias aeróbias mesófilas. Essas análises foram realizadas como estabelecido pela Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003<sup>26</sup>, e os resultados comparados a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001, norma reguladora da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)<sup>27</sup>.

As técnicas de contagem foram realizadas a partir das três diluições decimais em série consecutiva, nas quais a primeira diluição foi feita a partir da subamostra de pesagem de 25 g e, depois, adicionada a 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%. As diluições decimais seguintes foram feitas a partir de 1 mL da primeira diluição em 9 mL de solução salina peptonada a 0,1% seguidas de homogeneização.

#### Contagem de coliformes - teste presuntivo

De cada diluição decimal, uma alíquota de 1 mL foi transferida para três conjuntos de três tubos com caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertidos, os quais foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 h. A turbidez, juntamente com a presença de gás em um ou mais tubos de Durham, caracterizava a positividade.

#### Contagem de coliformes totais - teste confirmativo

Alíquotas de cada tubo considerado positivo no teste presuntivo foram transferidas pelo uso de alça bacteriológica para tubos com caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL), com tubos de Durham invertidos sendo incubados à temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 h. Os resultados foram expressos em log NMP/mL após comparação em uma tabela.

#### Contagem de coliformes termotolerantes - teste confirmativo

De forma semelhante, dos tubos LST considerados positivos no teste presuntivo, alíquotas de cada um foram transferidas pelo uso de alça bacteriológica para tubos com caldo *Escherichia coli* (EC) e tubos com caldo VBBL, com tubos de Durham invertidos sendo incubados à temperatura de  $45^\circ\text{C}$  durante 24 h, nos quais, através de comparação com a tabela, os resultados foram expressos em log NMP/mL.

#### Contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais

A técnica *pour plate* foi aplicada pelo uso de inóculo de 1,0 mL de cada uma das diluições decimais seriadas em placas de Petri em duplicata com ágar padrão para contagem previamente fundido. Após a homogeneização e a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas durante 48 h a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . As contagens foram realizadas em contador de colônias para placas após seleção das placas que apresentaram contagem entre 25 e 250 unidades

formadoras de colônias (UFC) e os resultados foram expressos como log UFC/g de amostra.

#### Pesquisa de *Salmonella* spp.

Inicialmente foi realizada a etapa de pré-enriquecimento, na qual cada alíquota de 25 g da subamostra de salada de alface foi adicionada a 225 mL de água peptonada tamponada e submetida à incubação a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 20 h. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 0,1 mL para tubos contendo caldo Rappaport Vassiliadis. Paralelamente, também foram transferidas alíquotas de 1 mL para tubos contendo caldo selenito cistina sendo incubados em banho de água a  $42^\circ\text{C}$  por 24 h constituindo a etapa de enriquecimento. Em continuidade, alíquotas do crescimento foram submetidas a espalhamento superficial em meios seletivos sólidos para obtenção de colônias isoladas sendo usadas placas com Ágar Ramback, Bismuto-sulfito, Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e *Salmonella-Shigella*, as placas foram incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. Três a cinco colônias suspeitas por placa foram selecionadas e inoculadas em ágar padrão, incubado a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h para posterior realização dos testes bioquímicos para verificação de comportamento típico de *Salmonella* spp.: ausência de urease, reações bioquímicas típicas no ágar TSI, descarboxilação ou não de lisina, reações bioquímicas e de motilidade no ágar SIM e o teste de oxidase em fitas de papel. Todos os testes foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h.

Para a análise estatística foram usados o Coeficiente de Correlação de Pearson, o teste t de Tukey sendo utilizado o programa PAST. Para todas as análises o nível de significância considerado foi de 5%<sup>28</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras controle de salada de alface dos restaurantes oscilaram entre quatro e seis log UFC/g (Tabela 1). A legislação vigente não prevê limites para a contagem total de bactérias aeróbias mesófilas para hortaliças frescas *in natura*, porém, segundo Morton<sup>29</sup>, alimentos que apresentam contagens totais de microrganismos aeróbicos acima de 6 log UFC/g começam a apresentar sinais de deterioração. Uma das amostras apresentou esta contagem elevada caracterizando possível deterioração.

Constatou-se a eficiência do fermentado acético em todas as concentrações e acidez (p < 0,05) na redução de bactérias aeróbias mesófilas (Tabela 1). Foi possível observar maior eficiência no tratamento com fermentado acético a 50% com resultados de redução de três a quase cinco ciclos decimais nas amostras submetidas a esse tratamento e variando de dois a até mais de quatro ciclos decimais nas amostras submetidas a tratamento com 10% de fermentado acético. Nesse aspecto, os resultados são similares aos obtidos por Entani et al.<sup>30</sup> que, na utilização de fermentados acéticos a 2,5%, obtiveram redução de três ciclos logarítmicos. No Brasil, de forma similar, Oliveira<sup>31</sup> obteve redução na contagem de bactérias aeróbias mesófilas de até dois ciclos logarítmicos na descontaminação de alface com vinagre a 2% e 20% por 15 min.



Nas acidezs 5 e 6 (em g. 100 mL<sup>-1</sup>) foram obtidos resultados de redução de quase cinco ciclos decimais enquanto que nas demais amostras as reduções obtiveram resultados onde alguns atingiram até quatro ciclos decimais. No entanto; estatisticamente, não houve diferença significativa entre os tratamentos com fermentado acético quanto às acidezs e às concentrações, porém houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao tratamento com fermentado acético em relação as amostras controle denotando que o uso de fermentado acético pode ser efetivo na redução bacteriana independente de concentração e acidez.

No Brasil, de forma similar, Silva<sup>32</sup> utilizando vinagre a 4% na descontaminação de couve, obteve redução significativa na contagem de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes para níveis aceitáveis.

Em concordância, Zerio-Egli et al.<sup>33</sup> verificaram que soluções a 1,6% e 2,5% de ácido acético usadas por 30 seg, 2 e 5 min, respectivamente, agiram na descontaminação de folhas verdes com reduções entre 1,5 e 4,0 log UFC/g de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e coliformes e concluindo que as reduções não foram dose ou tempo dependentes. No presente trabalho foi constatado que o uso de fermentado acético nas concentrações utilizadas causou a redução bacteriana.

De acordo com a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)*<sup>21</sup>, as contagens de coliformes totais em alface são usadas como parâmetros da carga microbiana presente, embora não sejam usadas como base legal, servem como um alerta das condições de higiene durante a manipulação e dos riscos oferecidos à saúde do consumidor.

Os resultados da contagem de coliformes totais nas amostras controle variaram entre 0,47 e 2,66 log NMP/g (Tabela 2). A

utilização do fermentado acético reduziu os valores NMP de coliformes totais em todos os tratamentos principalmente nas amostras dos restaurantes A e C, obtendo até resultados superiores a dois ciclos decimais. Nas amostras dos restaurantes B e D, foram encontradas baixas contagens de coliformes totais. Quanto ao efeito da concentração de fermentado acético, a redução foi mais evidente em tratamentos com concentração de 50% de fermentado acético e, quanto a acidez, o tratamento com acidez 5 foi o mais eficiente em ambas as concentrações (10% e 50%) alcançando até valores superiores a dois ciclos decimais. Oliveira<sup>26</sup> também constatou redução na contagem de coliformes totais de dois a três ciclos logarítmicos na descontaminação de alface com vinagre a 2% e 20% por 15 min. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com fermentado acético quanto às acidezs e às concentrações, porém houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao tratamento com fermentado acético em relação as amostras controle.

Para coliformes fecais, a legislação federal da Anvisa<sup>13</sup> fixou limite máximo de  $2 \times 10^2$  NMP/g ou 2,30 log NMP/g. Conforme a Tabela 3, as amostras de saladas de alface dos restaurantes A e B foram consideradas impróprias para consumo segundo a legislação. Observou-se maior eficiência de redução bacteriana nessas amostras por meio do tratamento com fermentado acético, já que apresentavam maior quantidade de coliformes, consequentemente houve maior eficiência com redução de dois a quase três ciclos decimais.

Quanto aos coliformes fecais, não houve diferença significativa entre os tratamentos com fermentado acético quanto às acidezs e às concentrações, porém houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao tratamento com fermentado acético em relação as amostras controle.

**Tabela 1.** Resultados (em média aritmética) da utilização de fermentado acético em diferentes concentrações e acidezs na descontaminação de amostras de salada de alface quanto à análise de contagem de bactérias aeróbias mesófilas (em log UFC/g).

Restaurante	Controle	Fermentado acético					
		Acidez 4		Acidez 5		Acidez 6	
		10%	50%	10%	50%	10%	50%
A	5,07	3,11	2,04	3,07	2,11	3,43	2,51
B	6,08	3,57	2,04	2,79	1,54	3,57	1,70
C	4,69	1,17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
D	5,49	2,14	1,60	2,53	1,30	1,00	1,65

**Tabela 2.** Resultados da utilização de fermentado acético em diferentes concentrações e acidezs na desinfecção de amostras de salada de alface quanto à análise de contagem de coliformes totais (em log NMP/g).

Restaurante	Controle	Fermentado acético					
		Acidez 4		Acidez 5		Acidez 6	
		10%	50%	10%	50%	10%	50%
A	2,66	0,84	0,47	0,47	0,47	0,56	0,47
B	0,85	0,55	0,47	0,47	0,47	0,56	0,47
C	2,38	0,60	0,47	0,47	0,47	0,95	0,60
D	0,85	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47



Tabela 3. Resultados da utilização de fermentado acético em diferentes concentrações e acidez na desinfecção de amostras de salada de alface na análise de coliformes fecais (em log NMP/g).

Restaurante	Controle	Fermentado acético					
		Acidez 4		Acidez 5		Acidez 6	
		10%	50%	10%	50%	10%	50%
A	2,66	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
B	3,04	1,18	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
C	0,95	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
D	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48

Entani et al.<sup>30</sup>, fazendo uso de diferentes tipos de fermentados acéticos, constataram sua forte ação bacteriostática em 34 linhagens bacterianas encontrando também atividade bactericida em *E. coli* enteropatogênica e enterohemorrágica, sendo a última bastante resistente à acidez. A redução observada na quantidade de coliformes fecais na presente pesquisa indicou também a eficiência do fermentado acético.

Semelhantemente, Amoah et al.<sup>35</sup> constataram que a utilização de vinagre como sanitizante de alface em concentrações aproximadas de 33% e 17%, respectivamente por 1 min e acima de 10 min, removeu valores superiores a quatro ciclos logarítmicos de coliformes fecais. Na presente pesquisa, os resultados obtidos com relação à redução de coliformes fecais foram similares nas concentrações de fermentado acético a 10% e 50%.

Chang e Fang<sup>17</sup>, ao realizarem tratamento de alface inoculada ( $10^7$  UFCg<sup>-1</sup>) com vinagre comercial com ácido acético (pH 3,0) a 5% por 5 min, verificaram a redução da população em três ciclos logarítmicos de *E. coli* enterohemorrágica. Da mesma forma, Poimenidou et al.<sup>23</sup> demonstraram que, em comparação a outros agentes químicos e antimicrobianos naturais, o vinagre possuiu a maior atividade letal contra *E. coli* enterohemorrágica, com redução de 1,8-2,3 log UFC/g e 2.8 log UFC/g na contagem total de bactérias. Akbas e Ölmez<sup>18</sup> obtiveram redução de *E. coli* enterohemorrágica entre 1,3 e 1,7 log UFC/g em alfaces cortadas na utilização de ácido acético em tratamento entre 0,5% e 1,0% por 2 e 5 min. De forma semelhante, no presente estudo, obteve-se a redução superior a dois ciclos logarítmicos em amostras de dois restaurantes.

Não se detectou *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras de alface dos quatro restaurantes. Tais resultados classificam as amostras analisadas de acordo com a RDC da Anvisa<sup>22</sup> que estabeleceu para hortaliças *in natura* a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de produto, visando a preservação da saúde pública.

Sengun e Karapinar<sup>36</sup> constataram redução significativa de *Salmonella* Typhimurium em cenouras com o uso de vinagre de

uva a 4% com redução de 1,87 a 3,33 ciclos logarítmicos dependente do tempo de tratamento.

Nascimento et al.<sup>37</sup> relataram que as hortaliças consumidas cruas são susceptíveis a contaminações microbiológicas, pois não passam por nenhum tratamento térmico. Por isso, é importante fazer a desinfecção para reduzir o número de microrganismos.

De acordo com Azerêdo, Conceição e Stamford<sup>38</sup>, 100% das amostras de saladas cruas analisadas em um restaurante universitário estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente, embora tenha sido constatado em algumas amostras elevada contagem de aeróbios mesófilos, o que também ocorreu na presente pesquisa. Isso mostra que, mesmo não sendo detectada *Salmonella*, os estabelecimentos devem se adequar às práticas de higiene e manipulação que envolvem o produto.

Corroborando sua ação, o uso de ácido acético em concentrações de 1 a 2% reduziu em 0,52 a 2,78 ciclos logarítmicos as populações de *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* em alface e maçãs orgânicas<sup>39</sup>.

## CONCLUSÕES

Embora não tenha sido constatada a presença de *Salmonella* spp., as amostras coletadas em três restaurantes estavam comprometidas higiênica e sanitariamente devido à presença elevada de bactérias aeróbias mesófilas e coliformes totais além de coliformes fecais acima dos padrões legais. Houve diferença estatística entre as saladas controle e as tratadas com fermentado acético de maçã, independentemente das concentrações e acidez, com redução significativa das contagens de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e fecais. Nas amostras em não conformidade, houve restabelecimento aos padrões aceitos legalmente devido a sensível redução na quantidade de coliformes fecais. O fermentado acético demonstrou ser uma alternativa eficiente e de fácil acesso para utilização em saladas cruas de vegetais para descontaminação bacteriológica.

## REFERÊNCIAS

1. Pezzuto A, Belluco S, Losasso C, Patuzzi I, Bordin P, Piovesana A et al. Effectiveness of washing procedures in reducing *Salmonella enterica* and *Listeria*

*monocytogenes* on a raw leafy green vegetable (*Eruca vesicaria*). Front Microbiol. 2016;7:1663. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01663>



2. Sirsat SA, Neal JA. Microbial profile of soil-free versus in-soil grown lettuce and intervention methodologies to combat pathogen surrogates and spoilage microorganisms on lettuce. *Foods*. 2013;2(4):488-98. <http://doi.org/10.3390/foods2040488>
3. Behrens JH, Barcellos MN, Frewer LJ, Nunes TP, Franco BDGM, Destro MT et al. Consumer purchase habits and views on food safety: a brazilian study. *Food Control*. 2010;21(7):963-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.018>
4. Beuchat LR, organizador. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Geneva: World Health Organization; 1998[acesso 2 out 2018]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO\\_FSF\\_FOS\\_98.2.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO_FSF_FOS_98.2.pdf)
5. Adami AAV, Dutra MBL. Análise da eficácia do fermentado acético como sanitizante na alface (*Lactuca sativa*, L.). *REAS*. 2011;3;134-44.
6. Keskinen LA, Annous BA. Efficacy of adding detergents to sanitizer solutions for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on romaine lettuce. *Int J Food Microbiol*. 2011;147(3):157-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.002>
7. Slayton RB, Turabelidze G, Bennett SD, Schwensohn CA, Yaffee AQ, Khan F et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 associated with romaine lettuce consumption. *Plos One*. 2011;8(2):e55300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055300>
8. Hilborn ED. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med*. 1999;159(15):1758-64. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.15.1758>
9. Marder EP, Garman KN, Ingram LA, Dunn JR. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bagged salad. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(8):593-5. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1726>
10. Gajraj R, Pooransingh S, Hawker J, Olowokure B. Multiple outbreaks of *Salmonella braenderup* associated with consumption of iceberg lettuce. *Int J Environ Health Res*. 2012;22(2):150-5. <https://doi.org/10.1080/09603123.2011.613114>
11. L'Ecuyer PB, Diego J, Murphy D, Trovillion E, Jones M, Sahm DF et al. Nosocomial outbreak of gastroenteritis due to *Salmonella senftenberg* clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 1996;23(4):734-42. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.4.734>
12. Macdonald E, Heier BT, Nygard K, Torunn S, Cudjoe KS, Skjerdal T et al. *Yersinia enterocolitica* outbreak associated with ready-to-eat salad mix, Norway, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(9):1496-9. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120087>
13. Nuorti JP, Niskanen T, Hallanvuoto S, Mikkola J, Kela E, Hatakka M et al. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce. *J Infect Dis*. 2004;189(5):766-74. <https://doi.org/10.1086/381766>
14. Frank JF, 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, UK.
15. Secretaria de Saúde de São Paulo. Portaria CVS Nº 6, de 10 de março de 1999. Aprova o regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênicosanitário em estabelecimentos de alimentos. *Diário Oficial Estado*. 12 mar 1999.
16. Singh, S, Ritesh W, Soberly M, Baby Z, Baite H, Mishra S et al. A review on postharvest management and advances in the minimal processing of fresh-cut fruits and vegetables. *J Microbiol Biotech Food Sci*. 2019;8(5):1178-87. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.8.5.1178-1187>
17. Chang JM, Fang T. 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 Microbiol*. 2007;24(7-8):745-51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.005>
18. Akbas MY, Olmez H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Lett App Microb*. 2007;44(6):619-24. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02127.x>
19. Figueiredo FF. Desinfecção de alfaces por ação do cloro e do vinagre e desenvolvimento de um sistema de segurança para alface em estabelecimentos de restauração coletiva [dissertação]. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa; 2013[acesso 20 mar 2013]. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/5963>
20. Nascimento M, Silva N, Catanozi MPLM, Silva KC. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na descontaminação de uva. *Braz J Food Technol*. 2003;6(1):63-8.
21. Souza GC, Spinosa WA, Oliveira TCRM. Sanitizing action of triple-strength vinegar against *Escherichia coli* on lettuce. *Hortic Bras*. 2018;36(3):414-8. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620180321>
22. Ramos B, Brandão TRS, Teixeira P, Silva CLM. Balsamic vinegar from Modena: an easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce. *Food Control*. 2014;42:38-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.029>
23. Poimenidou SV, Bikouli VC, Gardeli C, Mitsi C, Tarantilis PA, Nychas GJ et al. Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *E. coli* O157:H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. *Int J Food Microbiol*. 2016;220:6-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.013>
24. Arvanitoyannis IS, Bouletis A, Papa EA, Gkagtzis DC, Hadjichristodoulou C, Papaloucas C. The effect of addition of olive oil and “aceto balsamico di Modena” wine vinegar in conjunction with active atmosphere packaging on the microbial T and sensory quality of “lollo verde” lettuce and rocket salad. *Anaerobe*. 2011;17(6):303-6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.010>



25. Vijayakumar C, Wolf-Hall CE. Minimum bacteriostatic and bactericidal concentrations of household sanitizers for *Escherichia coli* strains in tryptic soy broth. *Food Microbiology*. 2002;19(4):383-8. <https://doi.org/10.1006/fmic.2002.0459>
26. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial União*. 18 set 2003.
27. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial União*. 2 jan 2001.
28. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. Paleontological statistics software package for education and data: analysis. *Paleo Electronica*. 2001;4(1):1-9.
29. Morton RD. Aerobic plate count. In: Downes FP, Ito K, editores. *Compendium of methods for the microbiological examinations of foods*. Washington: American Public Health Association; 2001. p. 63-6.
30. Entani E, Asai M, Tsujihata S, Tsukamoto Y, Ohta M. Antibacterial actin of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7 Part 1: examination of bacteriostatic and bactericidal activities. *Kansenshogaku Zasshi*. 1997;71(5):443-50.
31. Oliveira ABA. Comparação de diferentes protocolos de higienização de alface (*Lactuca sativa*) utilizados em restaurantes de Porto Alegre - RS [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005[acesso 19 set 2018]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/5885>
32. Silva APG. Eficácia da água sanitária e do vinagre como sanitizantes de couve (*Brassica oleracea* L.) [monografia]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2016.
33. Zerio-Egli CN, Sujata AS, Neal JA. Development of a novel economical device to improve post-harvest processing practices on small farms. *Food Control*. 2014;44:152-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.057>
34. International Commission on Microbiological Specification for Foods - ICMSF. International Union of Microbiological Societies - IUMS. APCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos: análise de perigos e pontos críticos: qualidade e segurança microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela; 1997[acesso 14 fev 2018]. Disponível em: <http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Ojectives/GuiaSimplificadoPO.pdf>
35. Amoah P, Drechsel P, Abaidoo RC, Klutse A. Effectiveness of common and improved sanitary washing methods in selected cities of West Africa for the reduction of coliform bacteria and helminth eggs on vegetables. *Trop Med Int Health*. 2007;12(supl2):40-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01940.x>
36. Sengun IY, Karapinar M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). *Int J Food Microbiol*. 2004;96(3):301-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.010>
37. Nascimento WM, Cantliffe DJ, Huber DJ. Seed aging affects ethylene production and endo-b-mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature. *Seed Sci Tech*. 2005;33(1)11-17. <https://doi.org/10.15258/sst.2005.33.1.02>
38. Azerêdo GA, Conceição ML, Stamford TLM. Qualidade higiênico-sanitária das refeições em um restaurante universitário. *Hig Alim*. 2004;18(25):74-8.
39. Park SH, Choi MR, Park KH, Chung MS, Ryu S, Kang DH. Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. *J Food Sci*. 2011;76(6):293-8. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02205.x>

#### Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).