EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Escherichia coli*

MARIA ANTONIETA BARALDI

Bióloga

Orientador: Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1987

B224e Baraldi, Maria Antonieta
Efeito de diferentes ácidos na resistência
térmica de Escherichia coli. Piracicaba,
1987.
80p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria patogênica - Efeito de ácido.
 2. Bactéria patogênica - Resistência térmica.
- I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei
roz, Piracicaba.

CDD - 589.9

EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA RESISTÊNCIA
TÉRMICA DE *Escherichia coli*

Maria Antonieta Baraldi

Aprovada em: 15.05.1987

Comissão Julgadora:

Dr. Antonio Joaquim de Oliveira	ESALQ/USP
Dra. Elke J. Bran Nogueira Cardoso	ESALQ/USP
Dr. João Gustavo Brasil Caruso	ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira
Orientador

Aos meus pais, ALDO e DIRCE,
pelo apoio e estímulo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antônio Joaquim de Oliveira pela amizade, estímulo e orientação durante a realização deste trabalho;
- Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e ao Departamento de Tecnologia Rural, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pelos recursos que ofereceram, sem os quais não seria possível a realização do presente trabalho;
- Aos funcionários da Biblioteca Central pela colaboração na organização das referências bibliográficas;
- Ao Prof. Dr. João Gustavo Brasil Caruso, pela ajuda durante a realização do trabalho;
- Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos auxílios prestados.

SUMÁRIO

	<u>página</u>
RESUMO	v
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Efeito de ácidos na resistência térmica de microrganismos.....	4
2.2. Efeito de ácidos no desenvolvimento de mi- crorganismos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Material	26
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	26
3.1.2. Meios de cultura	26
3.1.2.1. Caldo nutriente	26
3.1.2.2. Nutriente ágar	27
3.1.2.3. Ágar com bile e vermelho- -violeta	28
3.1.3. Ácidos	28
3.2. Métodos	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Ácido acético	31
4.2. Ácido lático	43
4.3. Ácido cítrico	53
4.4. Ácido fosfórico	63
5. CONCLUSÕES	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA RESISTÊNCIA
TÉRMICA DE Escherichia coli

Autora: MARIA ANTONIETA BARALDI

Orientador: Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

RESUMO

Para se determinar o efeito da adição de baixas concentrações de ácidos na resistência de microrganismos ao calor úmido, cultura de *E. coli* IZ-923, foi submetida ao aquecimento a 55°C e 60°C em caldo nutriente, contendo 0,1%, ou 0,2% dos ácidos acético, lático, cítrico e fosfórico por um período de 12 min. A intervalos regulares de 4 min, amostras eram retiradas, resfriadas em banho de gelo e plaqueadas em nutriente ágar (N A) e ágar com bile e vermelho violeta (VRBA). Após incubação por 48 h a 37°C $\pm$ 0,5°C, as colônias foram contadas em contador tipo Quebec. Com o número de colônias desenvolvidas no meio N A foram calculadas as porcentagens de redução e os valores D_{55} e D_{60} . Com aquelas desenvolvidas no V R B A calcularam-se as porcentagens de danificação celular.

Os resultados encontrados permitem as seguintes conclusões:

1. Na maioria das vezes, a porcentagem de redução da população de *E. coli* IZ-923, aumentou com o aumento da concentração de ácidos adicionados e com a temperatura;
2. durante o aquecimento, tanto com a adição de 0,1% como 0,2% de ácido em ambas as temperaturas, pôde-se estabelecer a seguinte ordem de redução: acético > fosfórico > lático > cítrico;
3. as porcentagens de danificação celular foram semelhantes para todos os ácidos em ambas as concentrações de ácidos e temperaturas empregadas;
4. os valores D_{55} e D_{60} diminuíram com o aumento da concentração de ácidos; e da temperatura de aquecimento;
5. nas condições do presente trabalho não foi possível caracterizar uma diferença expressiva entre os ácidos empregados, com relação aos seus efeitos na resistência térmica de *E. coli* IZ-923.

EFFECT OF DIFFERENT ACIDS AND CONCENTRATIONS
ON THE E. coli THERMAL RESISTANCE

Author: MARIA ANTONIETA BARALDI

Adviser: Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

SUMMARY

In order to determine the effect of the addition of low concentrations of acids in the microrganismos heat resistance, E. coli IZ-923 culture, was submitted to heat at 55°C and 60°C in nutrient broth, containing 0.1% and 0.2% acetic, lactic, citric and phosphoric acids for a period of 12 minutes. Every four minutes samples were taken, cooled in ice bath and plated on nutrient agar (N A) and violet-red bile agar (V R B A). After incubation at 37°C $\pm$ 0.5°C for 48 hours, the colonies were counted in a Quebec type colony counter. The D₅₅ and D₆₀ values and the reduction percentages were calculated from the number of developed colonies on N.A. medium. The cellular injure percentages were calculated from the developed colonies on V R B A medium.

The conclusions that can be drawn from the results are:

1. the *E. coli* IZ-923 populations reduction percentage, in the most, raised as the added acid concentration and temperature increased;
2. either heating temperature at any of the concentrations showed the following acid reduction power: acetic > phosphoric > lactic > citric;
3. the cellular injure percentages were similar for all the acids in both concentrations and temperatures employed;
4. The D_{55} and D_{60} values decreased as the acid concentration and heating temperature increased;
5. At the present work conditions it was not possible to stablish any great difference regarding to the effect of all acids used on the *E. coli* IZ-923 heat resistance.

1. INTRODUÇÃO

A resistência dos microrganismos ao calor difere sensivelmente se: levedura, fungo ou bactéria. Os esporos das bactérias são muito mais resistentes que as leveduras e os fungos, por outro lado, as células vegetativas são muito menos resistentes do que seus esporos.

Desta forma, considera-se que a morte dos microrganismos pelo calor úmido é muito mais efetiva que pelo calor seco, levando à desnaturação de proteínas e inativação de enzimas necessárias para a sua respiração e multiplicação. Supõe-se que isto ocorra porque o aumento da temperatura intensifica o movimento Browniano, com isso rompem-se as pontes de hidrogênio, ligações de dissulfeto, etc., o que provoca desnaturação das proteínas e consequentemente a morte das células (JAY, 1978).

Um microrganismo após sofrer um tratamento térmico pode ser considerado viável, se se multiplicar quando subcultivado em um meio de cultura adequado e a resistência térmica de uma população microbiana deve ser medida pela presença de células viáveis, em relação ao

número inicial de microrganismos.

As células e os esporos de microrganismos diferem sensivelmente em sua resistência à altas temperaturas. Algumas dessas diferenças são o resultado de fatores que podem ser controlados, mas outras, são características dos próprios microrganismos e nem sempre podem ser explicadas (JAY, 1978).

A adição de pequenas quantidades de ácidos orgânicos para ajudar a reduzir o tempo e a temperatura requerida para esterilizar produtos alimentícios, é devido não só à toxidez do íon hidrogênio como também à molécula não dissociada. De um modo geral, as bactérias tornam-se mais resistentes quando o pH do meio se aproxima de 7,0 e tanto os esporos como as células vegetativas mostram uma menor resistência quando o pH é baixado ao redor de 5,5 (JAY, 1978).

É importante lembrar que, de nada adiantará eliminarmos os agentes deterioradores de um alimento, se desse tratamento térmico resultar um produto com sabor, aroma e cor alterados e com mudanças em detrimento de suas propriedades nutritivas.

Como a tolerância dos microrganismos ao calor é grandemente influenciada pelo pH do produto, sendo que, quanto mais baixo for o pH, menor será a resistência térmica dos microrganismos, torna-se evidente a importância do uso de ácidos em concentrações que não al-

terem as propriedades do alimento, assegurando desta forma a qualidade do produto.

Assim, no presente trabalho objetivou-se determinar o efeito dos ácidos acético, lático, cítrico e fosfórico nas concentrações de 0,1% e 0,2% na resistência térmica de *E. coli* IZ -923 quando submetida ao aquecimento às temperaturas de 55°C e 60°C.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeito de ácidos na resistência térmica de microrganismos

LEVINE & FELLERS (1940a), estudando a adição de pequenas quantidades de ácidos orgânicos para ajudar a reduzir o tempo e a temperatura requerida para esterilizar produtos alimentícios, encontraram que o efeito letal é devido, em sua maior parte, a toxicidade da molécula não dissociada.

A redução do tempo de morte térmica de vários microrganismos testes pela utilização de ácido acético em caldo nutriente, foi mais marcante no caso de esporulados aeróbicos como: *Bacillus cereus* e *Bacillus mentericus*, pois a um pH 6,6, necessitou de 100°C por 10 minutos para ser letal, enquanto que, a pH 5,5 a temperatura caiu para 60°C sob as mesmas condições. Para *Staphylococcus aureus* a temperatura letal foi 65°C a pH 6,6; e a pH 5,5 a temperatura diminuiu para 60°C.

Um estudo comparativo entre ácidos orgânicos, assim como suas propriedades tóxica e inibitória, foi

também realizado por LEVINE & FELLERS (1940a). A destruição total e redução do número de bactérias foram determinadas pelo contato do microrganismo-teste em solução ácida padrão durante 15 min seguida de plaqueamento em nutriente ágar. A *Salmonella aertrycke* foi inibida e destruída em caldo nutriente a pH 4,0 com 0,12% de ácido láctico, enquanto que, o ácido clorídrico necessitou de pH 4,0 (0,03% de HCl) para inibição e pH 3,1 (0,07% de HCl) para destruição e morte.

MYERS (1928), baseado no efeito da concentração do íon hidrogênio em acelerar a taxa de morte térmica de bactérias, estudou o efeito da concentração do íon hidroxil sob o mesmo aspecto.

A *Bacterium coli* foi exposta a 50°C e 55°C por 10 min em meio líquido de pH que variou de 7 a 13. A destruição completa dessa bactéria, quando exposta a 50°C ocorreu a pH 9,0, enquanto que, a 55°C o pH de destruição baixou para 8. Assim, a altas concentrações do íon hidroxil, a destruição da bactéria pelo calor é mais eficiente.

A redução do número de microrganismo ocorreu também a pH elevado em meio com glicina e hidróxido de sódio, pois no final de 16 min de aquecimento a 46°C e pH 9,89 a destruição da *Bacterium coli* foi total, enquanto que a pH 9,34 com 20 min de aquecimento, o número foi apenas reduzido. Neste caso, se o logarítmo do núme-

ro de sobreviventes fosse "plotado" versus o tempo, não se obteria uma reta e sim uma curva, mostrando que esta morte não foi logarítmica.

MITSTUDA & NAKAJIMA (1977) trabalharam com adição de vários ácidos orgânicos (acético, fórmico, propiônico e butírico) durante o cozimento de arroz, para prevenir o crescimento de bactérias e fungos. Após a lavagem, o arroz ficou imerso em uma solução de ácido acético na concentração de 0,5% durante 10 min, sendo em seguida cozido na mesma solução. O cozimento foi feito no interior de discos a 30°C, e preparado com a adição de uma solução de cloreto de sódio a 10% ou de ácido acético a 4,2%, em substituição à água. O tratamento com ácido acético preveniu escurecimento, retrogradação do amido, crescimento de bactérias e fungos e forneceu uma boa textura quando estocado por 15 dias.

BIGELOW & ESTY (1920), estudando a velocidade de morte térmica de esporos de alguns microrganismos termofílicos, verificaram que ela foi acelerada pelo aumento da concentração do íon hidrogênico. O tempo necessário para destruição desses termofílicos a 120°C em um meio de pH 4,6, foi ao redor de quatro vezes menor do que o tempo necessário para destruí-los a pH 6,0.

NELSON (1943) submeteu vários microrganismos entre eles, *Escherichia coli* a tratamento térmico em

meio líquido e subsequente plaqueamento em quatro diferentes meios por 48 h a 36,5°C. As células de *Escherichia coli* 57, que foram aquecidas a 55°C/5 min, tiveram uma redução de 10^8 para 10^6 células/ml; a 55°C/10 min diminuiu para 10^5 células/ml e a 57°C/5 min para 10^3 células/ml, usando nutriente ágar como meio de desenvolvimento.

A injúria térmica de microrganismos por meio de aquecimento tem sido caracterizada pela perda da integridade da membrana celular, quando demonstrada pelo vazamento de aminoácidos, íons potássio, aumento sensível de cloreto de sódio, degradação do ácido ribonucleico do ribossomo e algum outro dano metabólico (SHIBASAKI & TSUCHIDO, 1973).

Isto foi verificado pela exposição de células de *Escherichia coli* e *Candida utilis* à temperatura de 45°C a 60°C em solução tampão. As células de *Escherichia coli* aquecidas a 50°C/120 min reduziram sua viabilidade de 10^8 para 10^2 células/ml; a 55°C/70 min para 10^4 células/ml e a 60°C/10 min. para 10^5 células/ml. Constatou-se também que o efeito combinado do ácido sórbico e temperatura reduziu significativamente a viabilidade da *Escherichia coli*. A porcentagem de redução em valor D foi 61% quando submetida à temperatura de 55°C a pH 5,5. O ácido sórbico na destruição térmica de microrganismo parece inibir o mecanismo de recuperação celular após aquecimento, inibindo assim a síntese de novas pro-

teínas e atividade respiratória do mesmo (SHIBASAKI & TSUCHIDO, 1973).

ALLWOOD & RUSSELL (1970) relataram em seu trabalho, que o calor úmido mata células vegetativas por causar coagulação de proteínas e que isto poderia induzir ou mascarar outras mudanças. Estas informações estão de acordo com RAHN (1945), o qual sugere que a morte da bactéria, pelo calor úmido, pode ser devido à coagulação da proteína, embora muitos outros fatores como o tempo de contato, composição e pH do meio, número inicial de células e a resistência de microrganismos influenciam na inativação térmica.

STRANGE & SHON (1964) propuseram possíveis mecanismos para explicar o efeito letal da água quente sobre células vegetativas: coagulação de proteínas, inativação de enzimas, ruptura da parede celular lipídica, dano no mecanismo genético e quebra do RNA.

WEIDEL, et alii (1960) estudaram a parede celular de bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* e descreveram três camadas: mucopeptídeo, lipopolissacarídeo e lipoproteína, sendo que esta última pode ser rompida a temperaturas entre 75°C e 100°C.

HERSHEY (1939) descreve três efeitos que a *Escherichia coli* pode sofrer quando submetida ao tratamento térmico: respiração diminuída em caldo nutriente; prolongado período de latência na subcultura e finalmente

baixa viabilidade celular. A regeneração da função respiratória inativada pelo calor, ocorre a uma taxa constante, característica do crescimento normal da bactéria sendo acompanhado pelo crescimento fisiológico.

FALK, et alii (1939) observaram uma recuperação superior da *Escherichia coli* em meio contendo uma pequena quantidade de ágar, do que em meio sem ágar. Um progressivo período de tolerância foi também constatado na *Escherichia coli* submetida a tratamento térmico, assim como uma diminuição na viabilidade celular e no consumo de oxigênio, podendo até este ser reduzido em 90%, sem destruir células quando aquecidas a 52°C/15 min.

ELLIKER & FRAZIER (1938) estudaram a resistência da *Escherichia coli* partindo de células estoques incubadas em cinco diferentes temperaturas (28°C; 30°C; 30,5°C; 38,5°C e 40°C) por períodos variados. Essas culturas foram transferidas para frascos contendo leite e aquecidas a 53°C/30 min. A porcentagem de sobreviventes quando a temperatura de incubação foi de 38,5°C/21 h chegou a 65% e a redução de células foi de 10^7 para 10^6 células/ml. Durante a fase estacionária de crescimento, a porcentagem máxima de sobreviventes foi maior quando a temperatura de incubação esteve próxima da ótima para o crescimento da bactéria. A resistência térmica foi mais baixa quando a temperatura de incubação também foi baixa.

JORDAN, et alii (1947) em seus estudos com

Escherichia coli, submetida às temperaturas sub-letais de 47°C a 55°C em água agitada, revelaram que temperaturas de 53°C ou abaixo são insuficientes para matar todas as células. Para uma temperatura de 50°C e número inicial de $2,9 \times 10^8$ bactérias, após 45 min de aquecimento a pH 7,0 baixou para $2,6 \times 10^8$ bactérias, enquanto que a 55°C a população passou de $3,3 \times 10^8$ para $1,4 \times 10^3$ bactérias com 50 min de aquecimento. Somente a temperatura de 55°C com mais de 80 min de aquecimento, que foi possível alcançar 99,99% de redução.

LEMCKE & WHITE (1959) trabalharam com culturas de várias idades de **Escherichia coli**, as quais foram submetidas a tratamento térmico de 55°C. Para culturas de 2 a 4 h de idade o DRT (tempo de redução decimal) foi muito baixo, enquanto que, culturas maduras com mais de 8 horas de idade revelaram um tempo maior de morte. Assim as culturas que tinham um tempo de 12 h, 18 h e 24 h de incubação apresentaram um aumento no DRT com valores de 1,22; 1,45 e 2,45 min respectivamente. A curva de sobreviventes mostrou claramente que culturas de **Escherichia coli** aquecidas a 55°C em caldo nutriente com 3,5 h de idade ou com 5 h possuem duas partes respectivamente: uma com brusca inclinação seguida de uma leve e outra com o oposto. Apenas a cultura com 18 h de incubação apresentou um declínio contínuo a uma taxa constante. A técnica experimental envolveu resfriamento rápido e MEYNELL (1958) mostrou que células bacte-

rianas, em fase exponencial de crescimento, mudam rapidamente sua resistência ao frio em muitos diluentes, e que organismos em fase estacionária foram completamente resistentes.

RICHARDS & WHITE (1949) usaram uma temperatura de 10°C para resfriamento dos tubos testes após aquecimento, enquanto que MEYNELL (1958) usou 4°C, comprovando pequenos efeitos nos resultados, como já era esperado.

HEGARTY & WEEKS (1940) testaram a sensibilidade ao frio de culturas de *Escherichia coli* em banho de gelo a 0°C. A cultura com 2×10^4 bactérias/ml em caldo nutriente com 24 h foi mantida por 5 min. a 0°C antes de plaquear, e a resistência das células ao frio foi medida de 10 em 10 min graficamente, durante um período de 8 h.

A fase estacionária inicial foi de 40 min. e durante os primeiros 20 min não foi observada alteração no número de células sensíveis ao frio; somente aos 40 min que 20% do total das células viáveis foram suscetíveis ao choque térmico. Apenas 8% das células adultas mostraram sensibilidade ao frio, ao contrário das células jovens que tiveram sua sensibilidade estendida por toda fase logarítmica de crescimento.

2.2. Efeito de ácidos no desenvolvimento de microrganismos

LEVINE & FELLERS (1940b), estudando o efeito inibitório do ácido acético sobre microrganismos na presença de xarope ou salmoura, observaram que estes pouco alteraram a concentração do íon hidrogênio, causando pequeno efeito tóxico nas bactérias ou leveduras. O efeito do ácido acético em reduzir microrganismos foi determinado pelo contato de 15 min com a solução ácida. A solução foi preparada com 5 ml de água destilada em todos os tubos-testes, mais 5 ml de uma solução de ácido acético no primeiro tubo. Após misturar; 5 ml desta solução foi transferida para o segundo tubo, e assim sucessivamente. Cada tubo foi inoculado com 0,1 ml de cultura, agitado por 15 min e plaqueado. O mesmo procedimento foi feito numa outra etapa com 20% de xarope mais 5 ml de ácido e 5% de salmoura mais 5 ml de ácido.

Para *Salmonella aertrycke* a solução contendo água mais ácido; de pH 3,3 e acidez total de 0,15%, a redução foi de 98%; para a solução com salmoura mais ácido de pH 3,1 e acidez total de 0,15%; a mortalidade foi de 100% e para a solução com xarope mais ácido de pH 3,5 e acidez total de 0,15%, a mortalidade foi de 99%. No caso do *Staphylococcus aureus*, utilizando o mesmo procedimento, pH e acidez total de 0,17%; a redução do número de bactérias foi de 99%, 100% e 100%, respectivamente. Assim, o ácido acético inibiu o crescimento bacteriano qua-

se na proporção direta da quantidade presente. Apesar do efeito indireto em alterar a concentração do íon hidrogênio; o sal ou o xarope, adicionados à solução de ácido acético, causaram pequeno ou nenhum efeito tóxico na bactéria ou levedura. Similarmente, o sal ou o xarope exerceram pequeno ou nenhum efeito na porcentagem de acidez total. Verificou-se também que a ação tóxica do ácido acético no microrganismo foi mostrada não sendo devido unicamente a concentração do íon hidrogênio, embora o aumento desta concentração resulte na diminuição da resistência da bactéria ao calor.

RICE & PEDERSON (1954), em seus estudos sobre a atividade inibitória de vários ácidos orgânicos, revelaram que os ácidos oxálico, fórmico e láctico são aproximadamente quatro vezes mais eficientes em inibir germinação de esporos de *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*, que o málico, cítrico e acético em suco de tomate. A cultura usada foi isolada de suco de tomate flat-sour, ficando 24 h em caldo nutriente para posterior desenvolvimento em TGYE ágar durante 6 dias a 37°C. As células foram suspensas em 10 ml de solução salina (0,9%), filtradas e aquecidas a 95°C para destruição das células vegetativas. A suspensão-estoque foi utilizada para inocular os tubos testes contendo suco de tomate, os quais foram incubados por quatro semanas a 37°C. O efeito do pH, acidez titulável e capacidade buffer foi estudado em duas séries; uma sem ajustes de pH e outra com diferentes pHs

ajustados com NaOH e HCl, antes da esterilização. Para se determinar o efeito inibitório do ácido cítrico, a fim de se atingir níveis de 0,4; 0,5; 0,6 e 0,8% de citrato no suco, foi necessária suplementação com citrato de sódio. Somente a pH 4,5 com 10^3 esporos/ml e 0,8% de citrato no suco, foi possível inibir germinação e crescimento do *Bacillus coagulans*.

Para a série de suco de tomate sem ajuste de pH, os resultados indicaram que o pH foi o fator que exerceu maior influência no crescimento de *B. coagulans*, o qual ficou entre 4,10 e 4,32.

Uma comparação de oito ácidos orgânicos, quando presentes em suco de tomate, com base na molaridade, foi realizada. A concentração molar usada foi 0,0104; 0,0208; 0,03125 e 0,04166 M. Os resultados indicaram em ordem crescente a atividade inibitória dos mesmos: oxálico, fórmico, lático, málico, cítrico, pyrrolidonecarboxylic, propiônico e acético. Os três primeiros foram inibidos com 0,01M, enquanto que, os demais com 0,042 M; podendo isto indicar uma eficiência quatro vezes maior do oxálico, fórmico e lático em relação aos demais ácidos. Foi observado que a atividade inibitória desses ácidos orgânicos para *B. coagulans* teve uma relação com a constante de ionização. Assim, aqueles ácidos com constante de ionização mais alta - oxálico, fórmico e lático - exerceram uma atividade inibitória maior, enquanto que, o acético com baixa constante de ionização foi menos inibitório.

rio. Isto sugere que, o ânion é a parte efetiva da molécula, desde que ele esteja presente na mais alta concentração nesses ácidos, com a mais alta constante de ionização.

REID (1932), estudando a ação desinfetante de ácidos orgânicos como monobásico, hidroximonobásico, dibásico e tribásico sobre vários microrganismos testes, verificou que os monobásicos (acético, propiônico, butírico e valérico) são fracos bactericidas, porém de grande poder inibitório. Duas diluições foram testadas: uma bactericida contra *Bacillus coli*, *Bacillus typhosus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus pyocyaneus* P. e outra inibitória contra *Bacillus pyocyaneus* P. No método bactericida dez tubos foram testados, sendo que cada um continha 5 ml de uma solução ácida; 0,1 ml de inóculo; o qual foi adicionado com 30 seg de intervalo entre um tubo e outro, e mais 10 ml de meio. Os tubos ficaram suspensos em água a 20°C durante 5, 10 e 15 min, plaqueados e incubados a 37°C/48 h. Para o método inibitório usou-se 9 ml de meio nos tubos-testes com 0,1 ml de inóculo e 1 ml de solução ácida sendo plaqueados e incubados a 37°C/48 h.

A ação bactericida dos ácidos monobásicos sobre *Bacillus coli*, quando suspenso por 15 min a 20°C, foi mais forte para o ácido valérico do que para o acético, propiônico ou butírico com concentrações de 14 N; 1,5 N; 2 N e 5 N; respectivamente. Para o *B. pyocyaneus* P. a ação bactericida do ácido acético foi conseguida a pH

2,70 e inibitória a pH 5,11; enquanto que, com o ácido láctico a ação inibitória só foi conseguida a pH 4,65 e a bactericida no mesmo pH. No caso do ácido cítrico a ação bactericida sobre o *B. pyocyaneus* P. foi possível a pH 2,50 e a ação inibitória a pH 4,43. Para o autor, a ação bactericida dos ácidos dissociados fracos, foi devido as moléculas não dissociadas, e o número de cátions e ânions livres na solução foram insignificantes quando comparados com a quantidade de moléculas não dissociadas presentes.

Os hidroxí-ácidos monobásicos (glicólico e láctico) mostraram um marcante aumento no poder bactericida para *Staphylococcus aureus* e uma ação inibitória muito leve para todas as bactérias testadas. Este aumento da atividade bactericida dos hidroxí-ácidos quando comparado com os ácidos não hidroxí-ácidos, foi explicado pela combinação do íon hidrogênio com as partículas de proteína, formando um complexo proteínato, prevenindo assim a ação contra as células bacterianas. Consequentemente, a prevenção do crescimento bacteriano poderia então depender dos ânios e da molécula não dissociada.

O ácido tribásico como aconítico, foi mais tóxico para as bactérias do que o cítrico. Seu poder bactericida foi de 3 a 36 vezes maior que o do cítrico para *B. pyocyaneus* P., *B. typhosus*, *B. coli* e *S. aureus*. Os ácidos de fraco poder bactericida geralmente exibem um grande poder inibitório em meio líquido como, por exemplo, o

acético, propiônico e butírico foram mais inibitórios de todos os ácidos testados, conseqüentemente fracos bactericidas.

HENTGES (1967), em seu trabalho, também constatou resultado semelhante sobre a ação tóxica do íon hidrogênio pela adição de 0,128% de ácido acético e 0,023% de ácido fórmico (ambos produzidos por *Klebsiella*), a um meio ajustado com pH 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0. A adição de íons hidrogênio na forma de HCl para baixar o pH ou de NaOH para aumentar, não afetou o crescimento da *Shigella*. Assim, quando o pH do meio foi baixado, a toxidade dos ácidos para *Shigella flexneri* aumentou, entretanto quando ambos os ácidos estiveram ausentes no meio, a população de *Shigella* foi a mesma. A pH 6,5 a evidência de toxidade foi leve. A pH 6,0 os ácidos foram fortes bactericidas e a pH 5,5 a ação bactericida foi bem maior. A esse pH a população de *Shigella flexneri* esteve ao redor de 1/4 dos demais. Os resultados mostraram que a toxidade dos ácidos fórmico e acético foi grandemente influenciada pelo pH do meio, mas que, o aumento dessa toxidade não pode ser devido somente ao efeito do íon hidrogênio. No meio sem ácido (acético e fórmico) a população de *Shigella flexneri* foi a mesma, tanto a pH 6,0 quanto a pH 7,0. A adição de íons hidrogênio na forma de HCl para baixar o pH do meio para 6,0, não teve efeito no crescimento da *Shigella*. Por outro lado, o meio contendo ácidos fórmico e acético, a pH 6,0, inibiu fortemente o crescimento da bactéria. Isso indica que a atividade do íon

hidrogênio sozinho não pode explicar a toxidade dos ácidos fórmico e acético. Assim, as moléculas de ácido fórmico e acético não dissociadas, as quais aumentam com o abaixamento do pH do meio, são as responsáveis pela inibição do crescimento da *Shigella flexneri*.

WINSLOW & LOCHRIDGE (1906) procuraram estudar o poder desinfetante de dois ácidos minerais e dois ácidos orgânicos, sobre o *Bacillus typhoide* e *Bacillus coli* em água peptonada e de torneira. A água, o ácido e a suspensão bacteriana foram adicionadas em um frasco, o qual permaneceu parado por 40 min, seguido de plaqueamento em ágar-lactose e incubação por 24 h a 37°C. Para que o poder desinfetante do ácido clorídrico atingisse 100% de redução para o *Bacillus coli* em água de torneira, foi necessário uma solução ácida contendo 0,0123 N com 12,26 ppm de hidrogênio dissociado, enquanto que para água peptonada foi necessário 0,0978 N com 97,80 ppm de hidrogênio dissociado. Já a solução ácida contendo ácido sulfúrico necessitou de 0,0166 N com 16,57 ppm de hidrogênio dissociado em água de torneira e 0,1081 N com 108,1 ppm de hidrogênio dissociado em água peptonada para redução de 100% da bactéria. A porcentagem de redução do *Bacillus coli*, também com 40 min de exposição em água de torneira, foi de 100% com 0,0935 N de ácido acético e 93,50 ppm de hidrogênio dissociado, enquanto que, em água peptonada foi necessário 0,139 N com 139,5 ppm de hidrogênio dissociado. Para o ácido benzóico foi necessário 0,0199

N com 19,90 ppm de hidrogênio dissociado em água de torneira e 0,0473 N com 47,30 ppm de hidrogênio dissociado em água peptonada para se conseguir 100% de redução do **Bacillus coli**.

Os ácidos orgânicos como o benzóico e o acético são ativos para o **Bacillus coli** e também para o **Bacillus typhoide** à uma força na qual eles são, apenas levemente dissociados. Isto mostra que a toxidade desses ácidos é devido não somente ao íon hidrogênio, mas principalmente ao ânion ou à molécula não dissociada.

Os ácidos minerais como o clorídrico e o sulfúrico são fatais em determinada concentração, sendo também altamente dissociados.

A maioria dos trabalhos descrevem que a dependência do pH é menor do que o modo de ação da molécula não dissociada sobre microrganismos. EKLUND (1985) apresentou um modelo matemático compreendendo a atividade antimicrobiana de ambas as moléculas - não dissociada e dissociada - em um sistema de microcultura com ácido sórbico. Este modelo proposto para o ácido fraco (sórbito) teve validade para o benzóico e o propiônico, os quais, em sua forma dissociada, tiveram também propriedades antimicrobianas.

A **Escherichia coli** e **Staphylococcus aureus** foram mais sensíveis ao ácido sórbico não dissociado do que ao ácido benzóico não dissociado e a **E. coli** foi sen-

sível também aos ácidos dissociados.

HAYASHI et alii (1979) relataram o retardamento no crescimento de bactérias contaminantes como *Micrococcus* sp., durante o processo de fabricação do Shoyu-Koji pela adição de ácidos ao substrato-Koji.

O crescimento do *Micrococcus* sp. foi levemente retardado pela adição de ácidos clorídrico, lático e cítrico quando o pH do substrato foi mantido abaixo de 5,4. Por outro lado, o ácido acético exibiu um marcante efeito na redução do crescimento da bactéria a um pH acima de 5,4. Ficou claramente demonstrado que o efeito de retardamento no crescimento da bactéria, não foi somente devido ao abaixamento do pH do substrato.

A inibição do crescimento de *Micrococcus*, *Bacillus* e *Staphylococcus aureus* 1, em substrato-Koji pela adição de 0,5% de ácido acético, também foi confirmado, quando inoculados artificialmente com o propósito experimental. O ácido acético mostrou uma grande ação retardatória, não só no crescimento de muitas bactérias contaminantes, mas também de bactérias aeróbias Gram negativas, espécies de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, bactérias anaeróbicas facultativas Gram negativas, *Escherichia*, *Enterobacter* sp. e *Serratia*.

BERGEIN (1940) testando a toxidade de ácidos graxos voláteis (acético, lático e butírico) para *Escherichia coli*, constatou que a inibição do crescimento

ocorre a um pH mais alto na presença de uma mistura de ácidos, do que com cada um isoladamente.

Uma cultura de 24 h foi introduzida juntamente com a solução ácida, incubada durante 18 h a 40°C para posterior plaqueamento e contagem.

Com a solução de ácido acético a morte da *Escherichia coli* ocorreu a pH 6,0 com 0,1 N, enquanto que com a solução de ácido láctico, nesta mesma condição, o efeito foi nulo. Somente a pH 5,0 com 0,1 N de ácido láctico que o crescimento foi prevenido, ao passo que, neste mesmo pH com 0,05N de ácido butírico todas as células foram eliminadas. O limite de efetividade do ácido acético ou da mistura de acético e butírico ficou ao redor de 0,05 N a pH 6,0 ou 0,2 N a pH 6,25. O efeito tóxico desses ácidos foi devido, grandemente, à molécula ácida não dissociada presente, sendo que, esta proporção foi maior em alta acidez do que quando próxima da neutralidade.

GOEPFERT & HICKS (1969) estudaram o efeito do pH, temperatura e concentração de ácidos graxos voláteis no desenvolvimento da *Salmonella typhimurium*. A atividade bactericida dos ácidos fórmico, acético e propiônico sobre a bactéria aumentou quando o pH do meio diminuiu para uma mesma temperatura e tempo de incubação. Esse resultado está de acordo com a premissa de que a molécula do ácido não dissociada é a metade de um bactericida. Embora não de uma forma pronunciada, uma tendência geral em diminuir o efeito bactericida com o aumento do

comprimento da cadeia dos ácidos graxos, também foi observada.

O tempo de morte da *Salmonella typhimurium* a pH 5,0 e temperatura de 37°C foi de 8 h quando a concentração de ácido acético foi 0,5%, enquanto que, com 0,1% e 0,2% de ácido o tempo aumentou para 24 h. Resultados semelhantes foram verificados quando se variou a temperatura de incubação, pois a pH 5,0 com 0,5% de ácido acético foi necessário 1 h à 43°C para eliminar todas as bactérias, enquanto que a 37°C necessitou de 8 h e a 25°C mais de 72 h.

Para os autores a sensibilidade da *Salmonella typhimurium* a ácidos graxos voláteis depende não somente do pH do meio, mas também do comprimento da cadeia, da concentração do ácido, da temperatura e da composição do meio.

QUARTEY-PAPAFIO et alii (1980) determinaram a eficiência de ácidos graxos de cadeia curta (fórmico, acético e propiônico) como sanitizadores de carne. Vários microrganismos presentes na carne, entre eles coliformes, *Streptococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus* sp. foram pulverizados na superfície da carne juntamente com uma solução de ácido acético em concentrações crescentes de 1%, 2% e 3%. Cada solução foi testada a pH 1,0; 2,0 e no pH normal (sem ajuste). Para a solução de ácido acético a 3%, a porcentagem de morte dos 11 microrganismos testados variaram entre 70%, 48% e 27%

nos valores de pH respectivos. O mais efetivo sanitizador foi a combinação de 1% de ácido acético com 1% de ácido fórmico. Entretanto, eles não foram significativamente diferentes como sanitizadores em seu pH sem ajuste (2,1), destruindo 73% das células e a pH 2,0 ficando com 87% de destruição. A mistura de 2% de ácido acético com 0,1% de sorbato destruiu 60% dos microrganismos a pH sem ajuste (4,1); entretanto, com 2% de ácido acético a pH 2,0 a destruição diminuiu para 58% apenas.

No caso dos *Enterobacter* e *Micrococcus* nenhum sobreviveu por 60 seg com 1% de ácido fórmico, e na solução com 0,5% de ácido acético mais 0,25% de ácido propiônico e 0,25% de ácido fórmico a destruição dos *Micrococcus* foi de 100% enquanto que, dos *Enterobacter* foi de 80%.

A contagem das amostras tratadas com 1% de ácido acético, aumentou em mais de 2 ciclos logarítmicos após 7 dias de estocagem da carne enquanto que o controle (sem ácido) aumentou em 4,66 ciclos logarítmicos durante estocagem no mesmo período.

CHUNG & GOEPFERT (1970) testaram o crescimento da *Salmonella* em 13 diferentes ácidos para se detectar a tolerância desse microrganismo a baixos valores de pH. O pH mínimo no qual a *Salmonella* pôde crescer foi 5,4 para o ácido acético e 5,5 para o propiônico, sendo os dois mais restritivos para a bactéria, enquanto que, os demais ácidos favoreceram o crescimento a valores de pH

bem mais baixos. O crescimento limitado da *Salmonella* de-
pendeu de vários fatores, sendo o mais importante a pró-
pria molécula do ácido; seguido do efeito da temperatu-
ra, tensão relativa de oxigênio e nível de inóculo.

CLAPPER & POE (1947) relataram a utiliza-
ção de ácidos orgânicos por espécies de *Escherichia* e *Ae-
robacter* como única fonte de material orgânico no meio de
cultura. O meio foi ajustado a pH 7,0 onde trinta e seis
microrganismos isolados da água e incubados a 37°C por 72
h se desenvolveram. Os ácidos succínico, láctico, málico
e L-aspártico favoreceram o crescimento de todos os trin-
ta e seis microrganismos de ambos os gêneros, e o ácido
acético inibiu o crescimento de duas espécies de *Esche-
richia* e duas de *Aerobacter*, apenas.

Durante um estudo do crescimento de bacté-
rias em solução, na qual o cloreto de sódio e alguns áci-
dos orgânicos fornecem energia e fonte de carbono, uma re-
lação entre o número de átomos de carbono no ácido e a ha-
bilidade da bactéria em crescer foi observado por BRUCE
(1935). Os ácidos graxos insaturados contendo de um a
quatro átomos de carbono, isto é, com números pares, fa-
voreceram o crescimento da bactéria, mas aqueles com nú-
meros ímpares contribuíram muito pouco para o crescimento
da mesma. Os ácidos graxos de número ímpar como o propiô-
nico, propiólico e o térmico propiciaram um fraco cres-
cimento para *B. pyocyaneus*, enquanto que, ácidos de núme-
ro par como o acético, butírico e isobutírico promoveram

excelente crescimento para *B. piocyaneus* e moderado para *B. aertrycke* (rude) e *B. bronchosepticus*.

Assim, com o aumento do peso molecular dos ácidos graxos, o crescimento da bactéria diminuiu, e ácidos fracos com mais de 5 átomos de carbono, nenhuma diferença foi notada entre números pares e ímpares.

COHEN (1922), estudando o efeito da temperatura e concentração do íon hidrogênio sobre *Bacterium coli* e *Bacterium typhosium* na água, verificou que um pequeno aumento na concentração de íons hidrogênio, para *Bacterium coli* e *Bacterium typhosium* produz um efeito profundo na bactéria, entretanto o relativo aumento para íons hidroxil produz um efeito menor.

Os frascos contendo água foram submetidos a temperaturas de 0°C, 10°C, 20°C e 30°C durante 12 h, sendo a cultura em seguida plaqueada e incubada por 48 h a 37°C.

Para a *Bacterium coli* o Q_{10} para essas temperaturas a pH 3,5 foi 2,12; 4,34 e 3,76; enquanto que para pH 8,0 a variação foi bem menor, isto é, 1,22; 2,12 e 3,00; isto porque, a zona de tolerância de pH da *Bacterium coli* está próxima da neutralidade e da *Bacterium typhosium* está entre 5,0 e 6,4.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Escherichia coli

No presente trabalho, utilizou-se cultura pura de *E. coli* IZ-923, fornecida pela Micoteca do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ.

3.1.2. Meios de cultivo

Os meios de cultivo foram preparados de acordo com o Manual de Bacteriologia (DIFCO, 1978).

3.1.2.1. Caldo nutriente

O preparo do caldo nutriente foi feito pela reidratação de 8 g de caldo nutritivo bacteriológico, em 1000 ml de água destilada com adição de 0,3% de extrato de levedura desidratado. Em seguida 75 ml foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 125 ml e submetidos a

esterilização a 121°C por 15 min.

O caldo nutriente apresenta a seguinte composição:

Composto	g
- extrato de carne	3,00
- bactopectona	5,00

Esse meio de cultura foi utilizado para o cultivo e como substrato de aquecimento do microrganismo.

3.1.2.2. Nutriente ágar

Para o preparo do nutriente ágar, 23 g foram reidratadas, adicionadas de 0,3 g de extrato de levedura desidratada, em 1000 ml de água destilada. Após a reidratação, 250 ml do meio foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 500 ml e submetidos à esterilização a 121°C por 15 min.

O meio nutriente é assim constituído:

Composto	g
- extrato de carne	3,00
- bactopectona	5,00
- bactoágar	15,00

Esse meio foi utilizado para o sub-cultivo (plaqueamento) das amostras após o tratamento térmico.

3.1.2.3. Ágar com bile e vermelho-violeta (VRBA)

Esse meio foi preparado suspendendo-se 41,5 g de ágar com bile e vermelho-violeta em 1000 ml de água destilada fria e depois aquecido até a ebulição para a completa dissolução. Em seguida distribuíram-se 250 ml deste meio em Erlenmeyer de 500 ml esterilizado à 121°C por 15 min.

O meio VRBA foi empregado como meio seletivo para diferenciar as células, que sofreram danificações nos componentes celulares pela ação do calor; daquelas que se mantiveram intactas, isto é, sem nenhuma modificação celular.

3.1.3. Ácidos

Foram utilizados os ácidos acético, láctico, fosfórico e cítrico todos de qualidade P.A., Merck, em quantidades suficientes para elevar o pH a 0,1% ou 0,2%.

3.2. Métodos

Para o tratamento térmico 0,1 ml de cultura de *Escherichia coli* IZ-923 em caldo nutriente, com $\pm$ 24 h de incubação a 35°C $\pm$ 0,5°C, foram transferidos para Erlenmeyer de 125 ml contendo 75 ml de caldo nutriente

esterilizado. Após a inoculação os frascos Erlenmeyer foram incubados a 35°C por ± 19 h. Em seguida esses frascos sofreram aquecimento em banho-maria sob agitação constante, com controle de temperatura a 55°C e 60°C . A adição de ácido foi feita em quantidades correspondentes a 0,1% e 0,2%, assim que atingiu a temperatura de trabalho.

Para cada série de experimento, um frasco controle, sem adição de ácido, foi submetido ao mesmo procedimento acima descrito.

Alíquotas de 2,0 ml foram retiradas a intervalos regulares de 0; 4; 8 e 12 min de aquecimento e resfriadas imediatamente em banho de gelo. O tempo zero foi considerado após os frascos atingirem a temperatura de tratamento (aquecimento). A seguir cada amostra foi agitada em agitador de tubos durante 1,0 min, antes de se proceder a diluição em série para o sub-cultivo (plaqueamento). Feita a diluição em série uma alíquota de 1,0 ml desta diluição, após ser agitada, foi transferida para caixas de petri previamente esterilizadas.

A seguir ± 25 ml de nutriente ágar ou de VRBA foram adicionados às caixas de petri e homogeneizadas com as amostras por movimento giratório. Após solidificação dos meios de cultura, as caixas de petri foram transferidas para estufa e incubadas a 37°C por 48 h. Terminada a incubação, as colônias foram contadas em contador de colônias tipo Quebec. O número de colônias conta-

das multiplicado pelo inverso da diluição, foi considerado como sendo o número de microrganismo por mililitro de amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ácido acético

Os resultados do número de microrganismos sobreviventes após tratamento térmico de *E. coli* IZ-923 às temperaturas de 55°C e 60°C em caldo nutriente na presença de 0,1% e 0,2% de ácido acético a intervalos de tempo constante de quatro minutos, bem como as porcentagens de danificação celular e de redução microbiana, são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Na Tabela 9 são encontrados os valores D_{55} e D_{60} para *E. coli* IZ-923, quando submetida as mesmas condições de tratamento acima.

As porcentagens de redução (Tabela 1) de *E. coli* IZ-923 submetida a tratamento térmico a 55°C na presença de 0,1% de ácido acético, variaram de 61,3% a 88,9%, com o tempo de aquecimento. Para o mesmo tratamento térmico, entretanto sem adição de ácido (Tabela 1), a variação na porcentagem de redução microbiana foi de 45,5% a 88,5% durante o período de aquecimento, sendo menor nos primeiros 8 min. Nas mesmas condições acima, porém com a adição de 0,2% de ácido acético, a por-

TABELA 1. Porcentagem de redução (%R) e danificação (%D) de *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 55°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido acético*.

Tempo (min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$1,46 \times 10^5$	0		$7,18 \times 10^6$	0		$2,60 \times 10^4$	0		$1,86 \times 10^6$	0	
	VRBA	$5,86 \times 10^2$		99,5	$8,98 \times 10^3$		99,8	$1,10 \times 10^3$		95,7	$1,40 \times 10^4$		99,2
4	Na	$5,65 \times 10^4$	61,3		$3,91 \times 10^6$	45,5		$4,75 \times 10^3$	81,7		$1,10 \times 10^6$	40,8	
	VRBA	$1,13 \times 10^2$		99,8	$3,55 \times 10^3$		99,9	$1,73 \times 10^2$		96,3	$5,88 \times 10^3$		99,4
8	Na	$2,45 \times 10^4$	83,2		$1,81 \times 10^6$	74,7		$2,25 \times 10^3$	91,3		$4,86 \times 10^5$	73,8	
	VRBA	$0,42 \times 10^2$		99,8	$6,83 \times 10^2$		99,9	$0,73 \times 10^2$		96,7	$1,40 \times 10^3$		99,7
12	Na	$1,61 \times 10^4$	88,9		$0,82 \times 10^5$	88,5		$0,96 \times 10^3$	96,3		$1,83 \times 10^5$	90,0	
	VRBA	$0,43 \times 10^1$		99,9	$3,88 \times 10^2$		99,5	$0,56 \times 10^1$		99,4	$0,71 \times 10^3$		99,6

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

TABELA 2. Porcentagem de redução (%R) e danificação (%D) de *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido acético*.

Tempo (Min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$5,51 \times 10^4$	0	99,9	$1,05 \times 10^5$	0	97,7	$5,55 \times 10^4$	0	98,7	$2,87 \times 10^5$	0	99,6
	VRBA	$1,06 \times 10^1$			$2,37 \times 10^3$			$6,83 \times 10^2$			$7,40 \times 10^2$		
4	Na	$1,02 \times 10^4$	81,4	99,9	$5,55 \times 10^4$	47,1	99,0	$0,95 \times 10^4$	82,7	99,3	$1,55 \times 10^5$	28,8	99,8
	VRBA	$0,23 \times 10^1$			$5,40 \times 10^2$			$0,58 \times 10^2$			$2,48 \times 10^2$		
8	Na	$7,35 \times 10^3$	86,6	100	$2,65 \times 10^4$	74,7	99,5	$4,31 \times 10^3$	92,2	100	$2,90 \times 10^4$	86,6	99,8
	VRBA	0			$1,30 \times 10^2$			0			$4,38 \times 10^1$		
12	Na	$1,80 \times 10^3$	96,7	100	$0,85 \times 10^4$	91,9	98,9	$1,18 \times 10^3$	97,8	100	$1,46 \times 10^4$	93,3	99,9
	VRBA	0			$8,65 \times 10^1$			0			$1,28 \times 10^1$		

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

centagem de redução variou de 81,7% a 96,3%; sendo que esta variação foi bem maior nos primeiros 8 min de aquecimento (Tabela 1). Para o tratamento térmico sem adição de ácido a porcentagem de redução foi de 40,8% a 90,0%, sendo menor do que aquela com ácido, principalmente nos primeiros oito minutos do aquecimento (Tabela 1).

Comparando a porcentagem de redução da *E. coli* IZ-923 que foi submetida a tratamento térmico a 55°C com 0,1% e 0,2% de ácido acético em caldo nutriente, verifica-se que houve uma redução crescente do número de microrganismo em ambos os casos e maior para a maior concentração de ácido.

As porcentagens de danificação celular da *E. coli* IZ-923, que sofreu tratamento térmico a 55°C com e sem adição de 0,1% de ácido acético, ficaram sempre acima de 99,0% de forma que, a adição de 0,1% do ácido ao meio de aquecimento parece não ter contribuído para alterar o comportamento deste microrganismo em relação ao tratamento térmico, embora tenha dado uma redução um pouco mais alta com o aumento da concentração de ácido.

Os valores D_{55} , que significam o tempo em minutos necessário para destruir 90,0% de um determinado microrganismo a uma determinada temperatura letal, encontram-se na Tabela 9. Esses valores demonstram que a adição de ácidos, de alguma forma, afetou a resistência do microrganismo, uma vez que os valores, para esse parâmetro sem adição de ácido acético, foram

maiores do que aqueles na presença do mesmo, em ambas concentrações (Figura 1; 1a; 2 e 2a).

Na Tabela 2 encontram-se os resultados da porcentagem de redução de *E. coli* IZ-923 quando submetida ao tratamento térmico a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,1% e 0,2% de ácido acético, respectivamente.

Para o tratamento com adição de 0,1% de ácido as porcentagens de redução variaram de 81,4% a 96,7% no decorrer do período de aquecimento. A porcentagem de redução sem adição de ácido variou de 47,1% a 91,9%, entretanto, nos primeiros 4 min de aquecimento a redução foi menor (42,1%) quando comparada com a redução do tratamento com ácido.

O aumento da concentração de ácido acético para 0,2% resultou num aumento da porcentagem de redução da *E. coli* IZ-923 de 82,2% a 97,8% no decorrer do tempo de aquecimento, enquanto que no tratamento sem adição de ácido a porcentagem de redução variou de 28,8% a 93,3% (Tabela 2). Da mesma forma que no tratamento anterior, nos primeiros 4 min de aquecimento, ocorreu uma menor redução de microrganismos no tratamento sem adição de ácido em comparação com aquele que continha 0,2% de ácido acético, o que mostra o efeito do ácido na resistência térmica do microrganismo (Tabela 2). Nos demais intervalos de tempo, tanto para o tratamento com ácido quanto aquele sem ácido, os resultados seguiram uma redu-

FIG. 1 : Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente com adição de 0,1% de ácido acético

FIG. 1 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido acético

FIG. 2: Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente com adição de 0,2 % de ácido acético

FIG. 2 a: Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido acético

ção microbiana crescente.

Comparando o tratamento térmico a 60°C com adição de 0,1% e 0,2% de ácido acético durante o período de aquecimento de 12 min verifica-se que a redução microbiana foi crescente em ambas concentrações e maior na maior concentração de ácido.

As porcentagens de danificação celular da *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 60°C em caldo nutriente, com e sem adição de 0,1% de ácido acético, variaram de 99,9% a 100% e 97,7% a 99,5%; respectivamente (Tabela 2). A presença de ácido acético no meio pode justificar, talvez, a maior danificação nos componentes celulares da bactéria, uma vez que no oitavo minuto de aquecimento a danificação já tinha sido total, o que não ocorreu quando não havia ácido no meio.

Com a adição de 0,2% de ácido acético, a porcentagem de danificação celular, após 8 min de aquecimento, atingiu 100%, enquanto que no tratamento sem ácido com 12 min de aquecimento essa foi de 99,9% (Tabela 2).

Para BIGELOW & ESTY (1920) a velocidade de morte térmica de esporos de alguns microrganismos termofílicos foi acelerada pelo aumento da concentração do ion hidrogênio, pois a pH 4,6 o tempo para destruí-los chegou a ser quatro vezes menor do que a pH 6,0.

GOEPFERT & HICKS (1969) estudaram o efeito do pH, temperatura e concentração de ácidos graxos voláteis (fórmico, acético e propiônico) no desenvolvimento da *Salmonella typhimurium*. O tempo de morte da bactéria a pH 5,0 e temperatura de 37°C foi de 8 h quando a concentração do ácido acético foi 0,5%, enquanto que com 0,1% e 0,2% de ácido o tempo aumentou para 24 h.

Segundo esses autores, a atividade bactericida desses ácidos aumenta quando o pH do meio diminui para uma mesma temperatura e tempo de incubação. Esse resultado está de acordo com a premissa de que a molécula de ácido não dissociada é a metade de um bactericida. Embora não de uma forma pronunciada, uma tendência geral em diminuir o efeito bactericida com o aumento do comprimento da cadeia dos ácidos graxos, também foi notado (GOEPFERT & HICKS, 1969).

Para os autores a sensibilidade da *Salmonella typhimurium* a ácidos graxos voláteis depende não somente do pH do meio, mas também do comprimento da cadeia, da concentração do ácido, da temperatura e da composição do meio.

Para LEVINE & FELLERS (1940a) com o aumento da acidez ou da concentração do íon hidrogênio o crescimento da bactéria é inibido e consequentemente, a resistência ao calor diminuída. Isso foi confirmado por SHIBASAKI & TSUCHIDO (1973) uma vez que, submetendo células de

Escherichia coli a tratamento térmico a 55°C em solução tampão, foi necessário 70 min de aquecimento para se conseguir uma redução celular de 50%.

Resultados semelhantes foram conseguidos por JORDAN et alii (1947) com *E. coli* a qual foi aquecida a 55°C a pH 7,0 por mais de 80 min para se obter uma porcentagem de redução de 99,99%.

O presente trabalho realizado com *E. coli* IZ-923 submetida a aquecimento a 55°C e 60°C com adição de 0,1% e 0,2% de ácido acético por 12 min, revelou resultados semelhantes, pois a danificação e redução do número de bactérias foram maiores para a adição de 0,2% de ácido acético do que para 0,1% e o pH do meio de aquecimento foi de 4,68 - 4,69 e 4,90 - 4,98, respectivamente.

Os valores D_{60} (Tabela 9) mostram que a morte de *E. coli* IZ-923 foi mais rápida no tratamento sem ácido do que naquele com adição de 0,1% de ácido acético, (Figura 3 e 3a), embora as porcentagens de redução e de danificação principalmente, tenham sido bem superiores nos tratamentos com ácido.

Com o aumento da concentração de ácido para 0,2% o valor D_{60} foi maior para o tratamento sem ácido, mostrando o efeito da presença do ácido na destruição térmica da bactéria (Figura 4 e 4a).

Isto mostra que com adição de 0,1% de ácido acético, ao meio de aquecimento a 60°C , não foi possível

FIG. 3 : Curva de sobreviventes para *E.coli* Z-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,1% de ácido acético

FIG. 3 a : Curva de sobreviventes para *E.coli* Z-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente sem adição de ácido acético

FIG. 4: Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,2% de ácido acético

FIG. 4 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente sem adição de ácido acético

detectar o efeito da presença do ácido na resistência da bactéria ao tratamento térmico.

4.2. Ácido lático

Os resultados do número de microrganismos sobreviventes, quando *E. coli* IZ-923 foi submetida a tratamento térmico às temperaturas de 55°C e 60°C em caldo nutriente na presença de 0,1% e 0,2% de ácido lático, a intervalos de tempo constante de 4 min, são encontrados nas Tabelas 3 e 4. Nestas são encontradas também as porcentagens de redução e danificação do microrganismo.

Os valores D_{55} e D_{60} para as mesmas condições de tratamento térmico são encontrados na Tabela 10.

Os dados da Tabela 3 mostram que quando *E. coli* IZ-923 foi submetida a 55°C na presença de 0,1% de ácido lático a porcentagem de redução variou de 32,8% a 78,3% enquanto que, na ausência do ácido, essa redução variou de 44,8% a 60,2% no tempo de aquecimento. Quando *E. coli* IZ-923 foi submetida a 55°C houve uma redução da população de microrganismo de 65,4% a 87,9%, na presença de 0,2% de ácido e, quando o meio de aquecimento não continha o ácido, a porcentagem de redução variou de 48,3% a 80,6%.

Comparando a redução do número de bacté-

TABELA 3. Porcentagem de redução (%R) e danificação (%D) de *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 55°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido lático.*

Tempo (Min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$2,01 \times 10^5$	0	99,5	$1,65 \times 10^6$	0	99,4	$1,13 \times 10^4$	0	97,1	$2,48 \times 10^6$	0	99,8
	VRBA	$8,66 \times 10^2$			$8,26 \times 10^3$			$3,23 \times 10^2$			$3,85 \times 10^3$		
4	Na	$1,35 \times 10^5$	32,8	99,7	$0,91 \times 10^6$	44,8	99,4	$3,90 \times 10^3$	65,4	98,1	$1,28 \times 10^6$	48,3	99,8
	VRBA	$3,90 \times 10^2$			$5,03 \times 10^3$			$7,36 \times 10^1$			$1,61 \times 10^3$		
8	Na	$6,38 \times 10^4$	66,0	99,5	$7,50 \times 10^5$	54,5	99,6	$2,31 \times 10^3$	79,5	98,6	$7,80 \times 10^5$	68,5	99,8
	VRBA	$3,06 \times 10^2$			$3,00 \times 10^3$			$3,20 \times 10^1$			$1,49 \times 10^3$		
12	Na	$3,03 \times 10^4$	78,3	99,4	$6,56 \times 10^5$	60,2	99,7	$1,36 \times 10^3$	87,9	99,1	$4,80 \times 10^5$	80,6	99,9
	VRBA	$1,56 \times 10^2$			$1,85 \times 10^3$			$1,21 \times 10^1$			$4,46 \times 10^2$		

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

TABELA 4. Porcentagem de redução (%R) e danificação (%D) de *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido lático.*

Tempo (Min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$2,82 \times 10^4$	0		$4,75 \times 10^5$	0		$4,15 \times 10^3$	0		$3,83 \times 10^4$	0	
	VRBA	$4,47 \times 10^2$		98,4	$5,38 \times 10^2$		99,8	$6,91 \times 10^1$		98,3	$2,66 \times 10^2$		99,3
4	Na	$6,85 \times 10^3$	75,7		$1,89 \times 10^5$	60,2		$0,96 \times 10^3$	76,8		$1,26 \times 10^4$	67,1	
	VRBA	$5,20 \times 10^1$		99,2	$5,58 \times 10^1$		99,9	$1,46 \times 10^1$		98,4	$0,56 \times 10^2$		99,5
8	Na	$4,15 \times 10^3$	85,2		$5,11 \times 10^4$	89,2		$4,60 \times 10^2$	88,9		$3,73 \times 10^3$	90,2	
	VRBA	$2,13 \times 10^1$		99,4	$2,25 \times 10^1$		99,9	$0,55 \times 10^1$		98,8	$4,08 \times 10^1$		98,9
12	Na	$2,23 \times 10^3$	92,1		$3,50 \times 10^4$	92,6		$1,20 \times 10^2$	97,1		$2,16 \times 10^3$	94,3	
	VRBA	$1,56 \times 10^1$		99,3	$1,95 \times 10^1$		99,9	$1,00 \times 10^0$		99,1	$0,55 \times 10^1$		99,7

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

rias com adição de 0,1% e 0,2% de ácido lático, verificou-se que a redução foi superior (49,8%) para a maior concentração de ácido nos primeiros 4 min de aquecimento. Entretanto, aos 8 e 12 min de aquecimento as porcentagens de redução foram semelhantes para os dois tratamentos.

As porcentagens de danificação celular foram semelhantes em todos os tratamentos, tanto na presença como na ausência de ácido e foram sempre superiores a 99,0% (Tabela 3). Isto pode indicar que a presença de ácido lático não teve efeito sinérgico com o calor na danificação dos elementos celulares, mas aumentou o efeito letal do aquecimento, o que é demonstrado pelo aumento da porcentagem de redução com o aumento da concentração de ácido.

Os valores D_{55} (Tabela 10) demonstram o efeito sinérgico da presença do ácido lático na destruição térmica de *E. coli* IZ-923 em caldo nutriente, uma vez que esses foram maiores nos tratamentos sem ácido (Figuras 5; 5a; 6 e 6a).

Os dados da Tabela 4 demonstram que quando *E. coli* IZ-923 foi submetida à aquecimento de 60°C com 0,1% de ácido lático a porcentagem de redução variou de 75,7% a 92,1% e na ausência do ácido a variação foi de 60,2% a 92,6% para o mesmo tempo de aquecimento, enquanto que, quando *E. coli* IZ-923 foi submetida a 60°C na pre-

FIG 5 : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente com adição de 0,1% de ácido láctico

FIG.5a: Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido láctico

FIG. 6 : Curva de sobreviventes para *E. coli* 12-923 aquecida a 55°C em caldo nutritivo com adição de 0,2 % de ácido láctico

FIG. 6 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* 12-923 aquecida a 55°C em caldo nutritivo sem adição de ácido láctico.

sença de 0,2% de ácido lático as porcentagens de redução variaram de 76,8% a 97,1% e na sua ausência, de 67,1% a 94,3%, respectivamente, com o tempo de aquecimento.

Observando as porcentagens de redução da bactéria quando tratada com quantidades diferentes de ácido lático, verifica-se uma destruição constante e maior para a maior concentração de ácido no decorrer do tempo de aquecimento.

A porcentagem de danificação celular se destacou ao redor de 99,0% tanto na ausência quanto na presença do ácido em estudo (Tabela 4).

Os valores D_{60} encontrados na Tabela 10 mostram que, quando *E. coli* IZ-923 foi aquecida com 0,1% de ácido o tempo necessário para destruir 90,0% da população foi maior do que no tratamento sem adição de ácido (Figuras 7 e 7a). Por outro lado, quando se aumentou a concentração do ácido para 0,2% o valor D_{60} foi menor do que aquele no qual não houve adição do ácido (Figuras 8 e 8a).

Resultados semelhantes foram encontrados quando o ácido adicionado foi o ácido acético, o que implica, que no aquecimento de *E. coli* IZ-923, em caldo nutriente a 60°C esses dois ácidos, embora com características moleculares diferentes, mostram efeitos semelhantes na resistência térmica desse microrganismo.

FIG. 7 : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adiçao de 0,1% de ácido láctico.

FIG.7 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente sem adiçao de ácido láctico.

FIG. 8 : Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,2% de ácido láctico

FIG. 8 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente sem adição de ácido láctico

TABELA 9. Valores " D_T "^{1/} para E. coli IZ-923 submetida a tratamento térmico à 55°C e 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido acético.

Temperatura de aquecimento	0,1%		0,2%	
	com	sem	com	sem
55°C	14,90	16,98	13,78	16,26
60°C	12,82	11,36	9,20	9,57

^{1/} " D_T " - Expressa o tempo em minutos para reduzir 90% da população de bactéria.

TABELA 10. Valores " D_T "^{1/} para E. coli IZ-923 submetida a tratamento térmico a 55°C e 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido lático.

Temperatura de aquecimento	0,1%		0,2%	
	com	sem	com	sem
55°C	14,33	31,11	13,39	16,98
60°C	11,35	10,08	8,10	9,35

^{1/} " D_T " - Expressa o tempo em minutos para reduzir 90% da população de bactéria.

4.3. Ácido cítrico

Nas Tabelas 5 e 6 estão reunidos os resultados dos microrganismos sobreviventes quando *E. coli* IZ-923 foi submetida a tratamento térmico às temperaturas de 55°C e 60°C, a intervalos de tempo de 4 min, num período total de 12 min, com a adição de 0,1% e 0,2% de ácido cítrico. Nestas mesmas tabelas estão agrupados também os dados das porcentagens de redução e danificação celular da bactéria.

Para as mesmas condições de tratamento térmico foram calculados os valores D_{55} e D_{60} e os resultados estão concentrados na Tabela 11.

Os resultados da porcentagem de redução de *E. coli* IZ-923, quando submetida à temperatura de 55°C com adição de 0,1% de ácido cítrico, variaram de 54,2% a 83,6% no decorrer do tempo de aquecimento. Esses resultados estão próximos aos da porcentagem de redução quando a bactéria foi submetida ao aquecimento sem adição de ácido, ficando a mesma entre 52,7% e 80,3% (Tabela 5).

Quando se aumentou a concentração de ácido cítrico para 0,2% houve uma elevação, na porcentagem de redução da bactéria que variou de 66,1% a 86,7%, ao passo que no tratamento sem adição de ácido a porcentagem de redução variou de 56,7% a 82,5%, com o tempo de aquecimento (Tabela 5).

TABELA 5. Porcentagem de redução (%R) e danificação (%D) de E. coli IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 55°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido cítrico*

Tempo (min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$1,81 \times 10^5$	0		$2,08 \times 10^6$	0		$4,16 \times 10^4$	0		$1,81 \times 10^6$	0	
	VRBA	$8,06 \times 10^2$		99,5	$9,86 \times 10^3$		99,5	$3,10 \times 10^3$		92,5	$2,96 \times 10^4$		98,3
4	Na	$8,28 \times 10^4$	54,2		$9,83 \times 10^5$	52,7		$1,41 \times 10^4$	66,1		$7,83 \times 10^5$	56,7	
	VRBA	$3,00 \times 10^2$		99,6	$3,56 \times 10^3$		99,6	$1,02 \times 10^3$		92,7	$1,02 \times 10^4$		98,6
8	Na	$3,93 \times 10^4$	78,2		$5,83 \times 10^5$	71,9		$7,60 \times 10^3$	81,7		$5,11 \times 10^5$	71,7	
	VRBA	$1,45 \times 10^2$		99,6	$1,63 \times 10^3$		99,7	$4,29 \times 10^2$		94,3	$4,44 \times 10^3$		99,1
12	Na	$2,96 \times 10^4$	83,6		$4,06 \times 10^5$	80,3		$5,51 \times 10^3$	86,7		$3,16 \times 10^5$	82,5	
	VRBA	$1,12 \times 10^2$		99,6	$1,38 \times 10^3$		99,6	$3,01 \times 10^2$		94,5	$3,19 \times 10^3$		98,9

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

TABELA 6. Porcentagem de redução (%R) e danificação (%D) de *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido cítrico*.

Tempo (min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$5,70 \times 10^4$	0	99,0	$7,25 \times 10^5$	0	99,8	$3,76 \times 10^3$	0	85,2	$3,16 \times 10^5$	0	99,5
	VRBA	$5,60 \times 10^2$			$1,40 \times 10^3$			$5,58 \times 10^2$			$1,43 \times 10^3$		
4	Na	$2,09 \times 10^4$	63,3	99,2	$2,84 \times 10^5$	60,8	99,8	$0,90 \times 10^3$	76,0	82,2	$9,20 \times 10^4$	70,8	99,5
	VRBA	$1,68 \times 10^2$			$4,41 \times 10^2$			$1,60 \times 10^2$			$4,28 \times 10^2$		
8	Na	$1,13 \times 10^4$	80,1	99,5	$1,06 \times 10^5$	85,3	99,8	$0,44 \times 10^3$	88,3	90,0	$3,93 \times 10^4$	87,5	99,7
	VRBA	$6,01 \times 10^1$			$2,10 \times 10^2$			$4,35 \times 10^1$			$1,16 \times 10^2$		
12	Na	$6,39 \times 10^3$	88,7	99,3	$6,76 \times 10^4$	90,6	99,8	$1,70 \times 10^2$	95,4	87,9	$1,70 \times 10^4$	94,6	99,6
	VRBA	$4,30 \times 10^1$			$1,36 \times 10^2$			$2,06 \times 10^1$			$5,45 \times 10^1$		

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

Se se comparar as porcentagens de redução da *E. coli* IZ-923 quando aquecida a 55°C com 0,1% e 0,2% de ácido cítrico, verifica-se que praticamente houve uma redução constante no número de bactérias no decorrer do tempo de aquecimento, sendo um pouco superior quando se adicionou 0,2% de ácido cítrico.

A porcentagem de danificação celular da *E. coli* IZ-923, quando submetida a tratamento térmico a 55°C com e sem adição de 0,1% de ácido cítrico, ficou ao redor de 99,6%. Entretanto, quando se aumentou a concentração de ácido cítrico para 0,2% a porcentagem de danificação celular variou de 92,5% a 94,5% com o aumento do tempo de aquecimento. Já para o tratamento sem adição de ácido a porcentagem de danificação foi mais constante, variando entre 98,3% a 99,1% (Tabela 5).

Esta diminuição na porcentagem de danificação celular do tratamento com maior adição de ácido, pode demonstrar que a presença deste favoreceu a letalidade do processo de forma mais acentuada do que na danificação celular, uma vez que a porcentagem de redução caracteriza esse fato pela maior mortalidade.

O valor D_{55} para *E. coli* IZ-923, quando foi adicionado 0,1% de ácido cítrico ao meio de aquecimento, foi menor do que aquele sem adição de ácido (Figura 9 e 9a). Por outro lado, quando se aumentou a concentração para 0,2% ocorreu o oposto (Tabela 11). Este resultado

FIG. 9 : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente com adição de 0,1% de ácido cítrico.

FIG. 9 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido cítrico

foge completamente do que seria esperado de que com o aumento da concentração do ácido no meio, a resistência do microrganismo diminuísse (Figura 10 e 10a).

As porcentagens de redução da *E. coli* IZ-923 submetida à temperatura de 60°C em caldo nutriente na presença de 0,1% de ácido cítrico variaram de 63,3% a 88,7% e aquelas sem adição de ácido variaram de 60,8% a 90,6% (Tabela 6).

Somente nos primeiros 4 min de aquecimento é que a redução da bactéria foi maior no tratamento com adição de ácido, enquanto que aos 8 e 12 min de aquecimento as porcentagens de redução do tratamento sem adição de ácido foram maiores.

Sob as mesmas condições do tratamento térmico anterior, quando *E. coli* IZ-923 foi aquecida com 0,2% de ácido cítrico, as porcentagens de redução mostraram uma maior uniformidade durante o período de aquecimento. No tratamento com ácido os resultados variaram de 76,0% a 95,4% e sem adição de ácido de 70,8% a 94,6% (Tabela 6). Neste caso, por conseguinte, a maior concentração de ácido deve ter atuado sinergisticamente com o aquecimento, aumentando assim a redução do número de microrganismos.

Ao se comparar os resultados da porcentagem de redução da *E. coli* IZ-923, quando submetida ao tratamento térmico a 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de áci-

FIG. 10: Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente com adição de 0,2 % de ácido cítrico

FIG. 10 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido cítrico

do cítrico, pode-se notar uma destruição crescente e maior para a maior concentração de ácido no decorrer do período de aquecimento.

Com o tratamento térmico da *E. coli* IZ-923 à temperatura de 60°C em meio líquido na presença de 0,1% de ácido cítrico, a porcentagem de danificação celular permaneceu acima de 99,0% tanto para o tratamento sem ácido como naquele com adição. No caso da adição de 0,2% de ácido a variação não foi constante sendo, menor nos primeiros 4 min, ficando entre 82,2% e 85,2%. Por outro lado, no tratamento sem ácido os resultados se assemelharam aos da menor concentração de ácido, permanecendo sempre acima de 99,0%. Do mesmo que no tratamento térmico a 55°C com adição de 0,2% de ácido, a 60°C na mesma concentração de ácido, houve uma relativa redução na porcentagem de danificação celular, o que pode ser justificado pela maior redução do número de microrganismos durante o processo (Tabela 6).

Os valores D_{60} (Tabela 11) mostraram que a adição de ácido não contribuiu para a destruição dos microrganismos, pois seus valores são maiores ou semelhantes ao tratamento que não sofreu esta adição (Figuras 11; 11a; 12 e 12a).

FIG II : Curva de sobreviventes para *E.coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,1% de ácido cítrico

FIG.II a : Curva de sobreviventes para *E.coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente sem adição de ácido cítrico

FIG. 12: Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,2% de ácido cítrico

FIG. 12 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente sem adição de ácido cítrico

4.4. Ácido fosfórico

Nas Tabelas 7 e 8 são mostrados os dados do número de *E. coli* IZ-923 sobreviventes após sofrer tratamento térmico às temperaturas de 55°C e 60°C em caldo nutriente na presença de 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico a intervalos de tempo de 4 min. As porcentagens de danificação e redução da população bacteriana também estão reunidas nestas tabelas.

Os valores D_{55} e D_{60} da *E. coli* IZ-923, submetida aos mesmos tratamentos anteriores, são encontrados na Tabela 12.

Na Tabela 7 encontram-se as porcentagens de redução da *E. coli* IZ-923 após aquecimento a 55°C em caldo nutriente na presença de 0,1% de ácido fosfórico, a qual variou de 64,5% a 90,1%, e sem adição de ácido entre 61,1% a 86,3%; durante o período de aquecimento. Quando se aumentou a concentração de ácido fosfórico, para 0,2% as porcentagens de redução variaram de 68,5% a 88,9% e para o tratamento sem adição de ácido a variação foi de 67,0% a 88,6%, podendo esta semelhança indicar a não influência do ácido no tratamento em questão.

Comparando as porcentagens de redução da *E. coli* IZ-923 quando submetida ao tratamento térmico a 55°C com 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico, nota-se que nos primeiros 8 min de aquecimento houve um maior aumento na redução da população bacteriana na presença de

TABELA 7. Porcentagem de redução (%D) e danificação (%D) de *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 55°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico*.

Tempo (min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$3,44 \times 10^4$	0		$2,11 \times 10^6$	0		$3,31 \times 10^3$	0		$3,31 \times 10^6$	0	
	VRBA	$8,31 \times 10^2$		97,5	$3,26 \times 10^3$		99,8	$6,90 \times 10^2$		79,1	$6,95 \times 10^5$		99,9
4	Na	$1,22 \times 10^4$	64,5		$8,20 \times 10^5$	61,1		$1,04 \times 10^3$	68,5		$1,09 \times 10^6$	67,0	
	VRBA	$2,86 \times 10^2$		97,6	$1,23 \times 10^3$		99,8	$2,05 \times 10^2$		80,2	$2,15 \times 10^3$		99,8
8	Na	$6,61 \times 10^3$	80,7		$4,28 \times 10^5$	79,7		$5,71 \times 10^2$	82,2		$7,85 \times 10^5$	76,2	
	VRBA	$1,15 \times 10^2$		98,2	$6,66 \times 10^2$		99,8	$8,78 \times 10^1$		84,6	$1,03 \times 10^3$		99,8
12	Na	$3,40 \times 10^3$	90,1		$2,88 \times 10^5$	86,3		$3,67 \times 10^2$	88,9		$3,75 \times 10^5$	88,6	
	VRBA	$7,95 \times 10^1$		97,6	$4,44 \times 10^2$		99,8	$3,40 \times 10^1$		90,7	$7,75 \times 10^2$		99,7

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

TABELA 3. Porcentagem de redução (%R) e danificação (%D) de *E. coli* IZ-923 quando submetida a tratamento térmico a 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico*.

Tempo (Min)	Meio	0,1%						0,2%					
		com	%R	%D	sem	%R	%D	com	%R	%D	sem	%R	%D
0	Na	$6,91 \times 10^3$	0	92,9	$5,55 \times 10^5$	0	99,8	$7,05 \times 10^3$	0	98,0	$5,28 \times 10^5$	0	98,9
	VRBA	$4,88 \times 10^2$			$6,20 \times 10^2$			$1,40 \times 10^2$			$5,35 \times 10^3$		
4	Na	$2,45 \times 10^3$	64,5	94,2	$1,98 \times 10^5$	64,3	99,8	$1,85 \times 10^3$	73,7	98,9	$2,06 \times 10^5$	60,9	99,6
	VRBA	$1,41 \times 10^2$			$2,38 \times 10^2$			$1,93 \times 10^1$			$8,11 \times 10^2$		
8	Na	$8,83 \times 10^2$	87,2	94,2	$7,83 \times 10^4$	85,8	99,8	$8,73 \times 10^2$	87,6	99,3	$6,76 \times 10^4$	87,1	99,7
	VRBA	$5,11 \times 10^1$			$1,45 \times 10^2$			$5,50 \times 10^0$			$1,53 \times 10^2$		
12	Na	$6,53 \times 10^2$	90,5	97,9	$5,88 \times 10^4$	89,4	99,8	$2,90 \times 10^2$	95,8	99,6	$3,61 \times 10^4$	93,1	99,7
	VRBA	$1,35 \times 10^1$			$6,11 \times 10^1$			$1,16 \times 10^0$			$8,46 \times 10^1$		

* Esses resultados correspondem a média de três experimentos.

0,2% de ácido (68,5% a 82,7%) do que em igual período com 0,1% de ácido (64,5% a 80,7%). Entretanto, com 12 min de aquecimento ocorreu o contrário, para a maior concentração de ácido a porcentagem de redução foi menor (88,9%) do que para a menor concentração (90,1%), embora esta diferença tenha sido muito pequena (1,2%).

A porcentagem de danificação celular da *E. coli* IZ-923 ficou sempre acima de 99,0% em todos os intervalos de tempo, quando submetida à temperatura de 55°C sem adição de ácido. Por outro lado, nos tratamentos que receberam 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico essas porcentagens variaram de 97,6% a 98,2% e de 79,1% a 90,7%, respectivamente (Tabela 7). Isto é uma indicativa de que menos células sobreviventes no meio foram danificadas, mas que, ao compararmos com a porcentagem de redução, maior número de células foram destruídas com o aumento da concentração do ácido.

Os valores D_{55} para *E. coli* IZ-923 quando foram adicionados 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico durante o tratamento térmico, foram menores do que aqueles que não receberam adição do mesmo, o que demonstra que a adição de ácido fosfórico ao meio de aquecimento contribuiu para diminuir a resistência da bactéria ao calor (Figuras 13; 13a; 14 e 14a).

As porcentagens de redução, quando *E. coli* IZ-923 foi submetida a aquecimento de 60°C com 0,1% de

FIG 13 : Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente com adição de 0,1% de ácido fosfórico

FIG. 13a : Curva de sobreviventes para *E. coli* Z-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido fosfórico

FIG. 14: Curva de sobreviventes para *E.coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente com adição de 0,2% de ácido fosfórico

FIG. 14a: Curva de sobreviventes para *E.coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido fosfórico

ácido fosfórico, encontram-se na Tabela 8. A variação desta porcentagem foi de 64,5% a 90,5%; e sem adição de ácido a variação foi de 64,3% a 89,4% onde praticamente não houve diferença porcentual na destruição da bactéria pela adição de ácido. Quando se aumentou a concentração de ácido para 0,2%, a porcentagem de redução da bactéria variou de 73,7% a 95,8% e no tratamento sem adição de ácido a variação foi de 60,9% a 93,1%; ficando esta um pouco abaixo daquela com adição de ácido (Tabela 8).

Ao se comparar os resultados da porcentagem de redução da *E. coli* IZ-923, submetida à temperatura de 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico, nota-se que houve uma variação constante e crescente da menor para a maior concentração de ácido, embora as diferenças na redução bacteriana entre tratamentos com e sem adição de ácido não tenham sido expressivas.

A porcentagem de danificação celular, quando *E. coli* IZ-923 foi submetida a tratamento térmico à temperatura de 60°C com adição de 0,1% de ácido fosfórico esteve entre 92,9% a 97,9%; enquanto que, no tratamento sem ácido a porcentagem foi de 99,8% em todos os períodos de aquecimento. No caso do tratamento que sofreu adição de 0,2% de ácido fosfórico e naquele sem a sua adição, a porcentagem de danificação celular praticamente não variou, ficando entre 98,0% a 99,7% (Tabela 8).

A Tabela 12 reúne os valores D_{60} para *E.*

coli IZ-923 quando submetida a tratamento térmico com
adição de 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico e sem adição de
ácido. Esses valores na sua totalidade mostram que o
ácido fosfórico contribuiu de certa forma para acelerar a
letalidade do processo (Figuras 15; 15a; 16 e 16a).

FIG. 15: Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,1% de ácido fosfórico.

FIG. 15a: Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente sem adição de ácido fosfórico.

FIG. 16 : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 60°C em caldo nutriente com adição de 0,2% de ácido fosfórico

FIG. 16 a : Curva de sobreviventes para *E. coli* IZ-923 aquecida a 55°C em caldo nutriente sem adição de ácido fosfórico

TABELA 11. Valores " D_T "^{1/} para E. coli IZ-923 submetida a tratamento térmico a 55°C e 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido cítrico.

Temperatura de aquecimento	0,1%		0,2%	
	com	sem	com	sem
55°C	14,90	16,98	13,78	7,32
60°C	12,82	11,36	9,20	9,57

^{1/} " D_T " - Expressa o tempo em minutos para reduzir 90% da população de bactéria.

TABELA 12. Valores " D_T "^{1/} para E. coli IZ-923 submetida a tratamento térmico a 55°C e 60°C na presença de 0,1% e 0,2% de ácido fosfórico.

Temperatura de aquecimento	0,1%		0,2%	
	com	sem	com	sem
55°C	12,18	13,90	12,79	13,42
60°C	11,37	12,02	8,92	10,05

^{1/} " D_T " - Expressa o tempo em minutos para reduzir 90% da população de bactéria.

5. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem as seguintes conclusões:

1. Na maioria das vezes, a porcentagem de redução da população de *E. coli* IZ-923 aumentou com o aumento da concentração de ácidos adicionados e com a temperatura.
2. Durante o aquecimento, tanto com a adição de 0,1% como 0,2% de ácido em ambas as temperaturas, pôde-se estabelecer a seguinte ordem de redução: acético > fosfórico > lático > cítrico.
3. As porcentagens de danificação celular foram semelhantes para todos os ácidos em ambas as concentrações de ácidos e temperaturas de aquecimento.
4. Os valores D_{55} e D_{60} diminuíram com o aumento da concentração de ácidos e de temperatura de aquecimento.
5. Nas condições do presente trabalho não, foi possível caracterizar uma diferença expressiva entre os ácidos empregados com relação aos seus efeitos na resistência térmica de *E. coli* IZ-923.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLWOOD, M.C. & RUSSELL, A.D.. Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria. Advances in Applied Microbiology, New York, 12: 89-119, mar., 1970.
- BERGEIN, O.. Toxity of intestinal volatile fatty acids for yeast and *Escherichia coli*. Journal of Infections Diseases, Chicago, 66: 222-34, 1940.
- BIGELOW, W.D. & ESTY, J.R.. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. Journal of Infections Diseases, Chicago, 27: 602-18, 1920.
- BRUCE, W.F.. Growth of bacteria in organic acid media. The Journal of the American Chemical Society, Easton, 57(1): 382, jan./jun., 1935.
- CHUNG, K.C. & GOEPFERT, J.M.. Growth of *Salmonella* at low pH. Journal of Food Science, Chicago, 35(3): 326-28, may/jun., 1970.

- CLAPPER, W.E. & POE, C.F.. Study of the utilization of some organic acids by *Escherichia* and *Aerobacter*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 53(3): 363-64, mar., 1947.
- COHEN, B.. Desinfection studies: The effects of temperature and hydrogen: on concentration upon the variability of *Bact. coli* and *Bact. typhosun* in water. Journal of Bacteriology, Baltimore, 7(2): 183-223, mar., 1922.
- EKLUND, R.. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 2(3): 159-67, jul., 1985.
- ELLIKER, P.R. & FRAZIER, W.C.. Influence of time and temperature of incubation on heat resistance of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 36(1): 83-98, july, 1938.
- FALK, C.R. et alii. A comparative study of the use of varying concentrations of agar in the test medium used to detect contaminants in biologic products. Journal of Bacteriology, Baltimore, 37(2): 121-31, feb., 1939.
- GOEPFERT, J.M. & HICKS, R.. Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 97(2): 956-58, feb., 1969.

- HAYASHI, K. et alii. Retarding effect of acetic acid on growth of contaminated bacteria during Shoyu-Koji making process. Journal of Food Science, Chicago, 44 (2): 359-62, mar./apr., 1979.
- HEGARTY, C.P. & WEEKS, O.B.. Sensitivity of *Escherichia coli* to acid shock during the logarithmic growth phase. Journal of Bacteriology, Baltimore, 39(5): 475-84, may, 1940.
- HENTGES, D.J.. Influence of pH on the inhibitory activity of formic and acetic acids for *Shigella*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 93(6): 2029-30, jun., 1967.
- HERSHEY, A.D.. Factors limiting bacterial growth. VII. Respiration and growth properties of *Escherichia coli* surviving sublethal temperatures. Journal of Bacteriology, Baltimore, 38(5): 563-78, nov., 1939.
- JAY, J.M.. Food preservation by use of high temperature. In: _____. MODERN FOOD MICROBIOLOGY, 2^a ed. New York, D. Van Nostrand Company, 1978, cap. 12, p. 223-36.
- JORDAN, R.C. et alii. Studies in the dynamics of disinfection. VIII. The effect of lethal temperature on standard culture of *Bact. coli*. I. A detailed analysis of the variations of death-rate with time. Journal Hygiene, Cambridge, 45: 136-43, 1947.

- LEMCKE, R.M. & WHITE, H.R.. The heat resistance of *Escherichia coli* cells from cultures of different ages. Journal of Applied Bacteriology, London, 22(2): 193-201, mar., 1960.
- LEVINE, A.S. & FELLERS, C.R.. Action of acetic acid on food spoilage microorganisms. Journal of Bacteriology, Baltimore, 40(5): 399-515, may, 1940a.
- LEVINE, A.S. & FELLERS, C.R.. Inhibiting effect of acetic acid upon microorganisms in the presence of sodium chloride and sucrose. Journal of Bacteriology, Baltimore, 40(2): 255-69, aug., 1940b.
- MANUAL de Bacteriology: recopilacion de tecnicas. Madri, Laboratório Difco, 1978, 395 p.
- MEYNELL, G.G.. The effect of sudden chilling on *Escherichia coli*. The Journal of General Microbiology, Cambridge, 19(2): 380-89, oct., 1958.
- MITSUDA, H. & NAKAJIMA, K.. Storage of cooked rice. Journal of Food Science, Chicago, 42(6): 1439-43, 1977.
- MYERS, R.P.. The effect of hydroxyl ion concentration on the thermal death rate of *Bacterium coli*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 15(5): 341-56, may, 1928.
- NELSON, F.E.. Factors which influence the growth of heat-treated bacteria. Journal of Bacteriology, Baltimore, 45(4): 395-403, apr., 1943.

- QUARTEY-PAPAFIO, E.A. et alii. Short-chain fatty acids as sanitizers for beef. Journal of Food Protection, Ames, 43(3): 168-71, mar., 1980.
- RAHN, O.. Physical methods of sterilization of microorganisms. Bacteriological Reviews, Baltimore, 9(1): 1-48, mar., 1945.
- REID, J.D.. The disinfectant action of certain organic acids. American Journal of Hygiene, Baltimore, 16:540-56, 1932.
- RICE, A.C. & PEDERSON, C.S.. Factors influencing growth of *Bacillus coagulans* in canned tomato juice. II. Acidic constituents of tomato juice and specific organic acids. Food Research, Chicago, 19(1): 123-24, jan./feb., 1954.
- RICHARDS, T. & WHITE, H.R.B.. The heat disinfection of *Streptococcus faecalis*. Proceeding of Applied Bacteriology. Reading, 2:61, 1949.
- SHIBASAKI, I. & TSUCHIDO, T.. Enhancing effect of chemicals on the thermal injury of microorganisms. Acta Alimentaria, Budapest, 2(3): 327-49, 1973.
- STRANGE, R.E. & SHON, M.. Effect of thermal stress on viability and ribonucleic acid of *Aero. aerogenes* in aquean suspension. The Journal of General Microbiology, Cambridge, 34(1). 99-114, apr., 1964.

WEIDL, W. et alii. The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli strains B. The Journal of General Microbiology, Cambridge, 22(1). 158-66, may, 1960.

WINSLOW, C-E.A. & LOCHRIDGE, E.E.. The toxic effect of certain acids upon typhoid and colon bacilli in relation to the degree of their dissociation. Journal of Infections Diseases, Chicago, 3: 547-71, 1906.