

INATIVAÇÃO DE *Vibrio cholerae* SOB A AÇÃO DOS ÁCIDOS ACÉTICO E CÍTRICO

Vibrio cholerae inactivation under the influence of the acetic and citric acids

Hauston Barbosa de Almeida¹, Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira², Antonio Adauto Fonteles-Filho³, Leyla Maria de Oliveira Barros¹, Silvana Saker Sampaio⁴

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a inativação de Vibrio cholerae pelos ácidos cítrico e acético. Na primeira etapa foi testada a resistência de cepas de V. cholerae O1 Inaba, puras, cultivadas em TSB 1% NaCl, ao contacto com soluções aquosas desses ácidos nas concentrações de 0,1 a 1,0%. Não foram recuperadas células viáveis do vibrião colérico em nenhuma das concentrações dos dois ácidos testados. Na segunda etapa da pesquisa foram contaminadas amostras de camarões marinhos com 10⁷ células de dessa bactéria por mL. Posteriormente, subamostras de 25g de camarão foram tratadas com suco de limão puro, vinagre de vinho tinto, solução aquosa de ácido acético a 4% e ácido cítrico a 7%. Decorrido o tempo de contacto dos camarões com a cultura de V. cholerae (15 min.), foram efetuados testes de CPP em TCBS. Verificou-se que nenhuma das soluções utilizadas pôde inativar V. cholerae enquanto contaminante de camarões.

Palavras-chaves: *Vibrio cholerae, ácido acético, ácido cítrico, inativação.*

ABSTRACT

This research work was designed to evaluate the inactivation of Vibrio cholerae by the citric and acetic acids. In the first phase, the resistance of pure, O1 Inaba V. cholerae strains cultivated in TBS 1% was tested in contact with watery solutions of the citric and acetic acids under 0.1% to 1.0% concentrations. No viable cells of V. cholerae were retrieved under any of those tested concentrations. In the second phase samples of marine shrimps with 10⁷ cells per ml of that bacterium were contaminated. Later, 25-g of shrimp subsamples were treated with lemon juice, red wine vinegar, and watery solutions of 4% acetic acid and 7% citric acid. After the contact time with the V. cholerae culture (15 min.) expired, CPP tests on TCBS were made. As a general conclusion, it was found out that none of the used solutions were effective for inactivating V. cholerae as shrimp contaminant.

Key words: *Vibrio cholerae, acetic acid, citric acid, inactivation.*

¹ Engenheiro de Pesca.

² Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3207, Fortaleza, CE 60165-081. E-mail: regine@labomar.ufc.br

³ Bolsista-pesquisador do CNPq no Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3207, Fortaleza, CE 60165-081. E-mail: afontele@labomar.ufc.br

⁴ Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, CE 60451-970.

INTRODUÇÃO

De janeiro a novembro de 1999 já haviam sido confirmados no Brasil, 4.500 casos de cólera (Centro Nacional de Epidemiologia, 1999) e de 1991 a 1997 foram constatados, no Brasil, 333.055 casos da doença (Pan American Health Organization, 1997). O adequado cozimento dos alimentos e fervura da água poderia evitar a propagação dessa doença mas, principalmente em países orientais, onde existe uma infinidade de pratos exóticos, esta prática poderia significar a perda de características sensoriais e o valor nutritivo dos alimentos (Novak, 1996). Isto foi, de certo modo, comprovado em relação a crustáceos, pois o tratamento térmico prolongado pode alterar sua estrutura muscular (Vieira, 1990).

A existência de povos orientais vivendo no Brasil, fez com que, aos poucos, a população local assumisse seus hábitos ao temperarem saladas de verduras/legumes e pescados crus ou mal-cozidos com limão ou vinagre, achando que isto, além de conferir sabor ao prato, também protegeria o consumidor de possíveis patógenos causadores de toxinfecções alimentares.

O objetivo dessa pesquisa foi testar a resistência de cepas de *Vibrio cholerae* O1 puras e contaminantes artificiais do camarão-sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, muito usado em pratos (de cozimento duvidoso), frente a soluções aquosas de ácido acético e cítrico, em concentrações variando de 0,1 a 1,0 % ; soluções aquosas de ácido acético e cítrico a 4 e 7%, respectivamente, e vinagre e suco de limão. Com isso será avaliada a efetividade dos ácidos orgânicos em questão na inativação de *V.cholerae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma cepa de *Vibrio cholerae* O1, sorotipo Inaba, isolada de fezes de paciente com cólera, fornecida pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE), foi usada nos experimentos desse projeto.

Soluções aquosas de ácido acético glacial P.A (Merck) e ácido cítrico P.A (Merck) foram preparadas nas concentrações 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; e 1,0%, respectivamente nas relações V/V e P/V. Após a medição do seu pH em potenciômetro Hanna, modelo 8520, as soluções foram esterilizadas por filtração utilizando-se membrana Millipore 22 μ com auxílio de uma bomba de vácuo e, em seguida, estocadas em temperatura ambiente e renovadas a cada experimento.

Primeira fase

Esta fase trata da resistência de *V. cholerae* ao contato direto com as soluções ácidas, de acordo com

as seguintes etapas: (a) preparo do inóculo; (b) resistência de *V. cholerae* ao contato com soluções dos ácidos acético e cítrico.

A cepa de *V. cholerae*, mantida em TSA 1% NaCl, era repicada em 20 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) 1% NaCl e incubada por 20 h a 37°C. O inóculo era quantificado através do teste de Contagem Padrão em Placas (CPP) e pela técnica *spread plate* (ICMSF, 1978). O Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS) foi utilizado como meio de contagem, incubado por 18 h a 37°C.

De cada uma das concentrações dos ácidos acético e cítrico foram transferidos 10 mL para um conjunto de 10 tubos de ensaio estéril, sendo que em um tubo à parte foram colocados 10 mL de água destilada estéril como controle do experimento. Cada um dos 11 tubos recebeu 1 mL do inóculo de *V. cholerae*, mantido em contato com os ácidos por 15 min., após o que eram efetuadas as diluições em solução salina 0,85% estéril (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}). Procedia-se então ao plaqueamento empregando-se a técnica de inoculação *spread plate* e o Ágar TCBS como meio de contagem, sendo as placas incubadas a 37°C/18 h. A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) foi feita com um contador de colônias Phoenix, modelo EC-550A. Este experimento foi repetido cinco vezes.

Segunda fase

Esta fase trata da resistência de cepas de *V. cholerae* contaminantes de camarão ao contato com os ácidos orgânicos, de acordo com as seguintes etapas: (a) preparo do camarão a ser contaminado; (b) tratamento da cepa de *V. cholerae*; (c) contaminação do camarão; (d) resistência de *V. cholerae* contaminante de camarão ao contato com as soluções ácidas.

Para esta fase do experimento foram utilizadas 10 amostras do camarão-sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, adquiridas na feira de pescadao do Mucuripe (Fortaleza-Ceará), no período de março de 1999 a março de 2000. As amostras (cerca de 800 g) eram transportadas até o laboratório em caixa isotérmica com gelo, onde eram limpas de quaisquer contaminantes macroscópicos e transferidas para um Erlenmeyer de 2.000 mL. Os camarões eram lavados por duas vezes com água destilada e sobre eles eram jogados 100 mL de água fervente onde posteriormente eram aquecidos até ebulição, por mais 2 min. Após esse tempo a água era drenada e procedia-se à contagem de UFC/g de uma amostra de camarão (25 g) através do teste de CPP, utilizando-se a técnica do *spread plate* sobre TCBS.

A cultura pura de *V.cholerae* era repicada em 10mL de TSB 1%NaCl e incubada a 37°C/24h. Após a incubação a cultura era transferida para um erlenmeyer contendo 90 mL de TSB 1% NaCl e

novamente incubada por 20 h, tempo suficiente para a obtenção do inóculo desejado, ou seja 10^7 células / mL. Este inóculo era quantificado através da contagem (CPP) em TCBS.

O camarão livre de contaminação por *Vibrio* spp. era artificialmente contaminado com uma cultura de *V.cholerae* previamente quantificada. O tempo de contato da cultura com a amostra de camarão era de 5 min. e, ao final, a amostra era dividida em onze frações de 25 g e acondicionadas em recipiente estéril com tampa.

As amostras de camarão contaminadas foram colocadas em contato com as soluções aquosas dos ácidos acético e cítrico nas concentrações mencionadas anteriormente. O tempo de contato foi de 15 minutos após os quais as amostras eram homogeneizadas em 225 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 (Porto & Uboldi Eiroa, 1997) e diluído até 10^{-3} . As diluições eram então plaqueadas, em TCBS, em duplicata, através da técnica de espalhamento, e incubadas a $37^\circ\text{C}/18$ h. No controle do experimento, as amostras eram colocadas em contato com água destilada estéril. Foram feitas cinco repetições do ensaio. A recuperação de células de *V. cholerae* em camarão foi feita através do teste de CPP e os procedimentos utilizados para os experimentos com ambas as soluções ácidas foram idênticos.

Terceira fase

Esta fase trata da existência de *V. cholerae* contaminante de camarão ao contato com soluções ácidas. As amostras de camarão (com procedimento semelhante à segunda fase) eram colocadas em contato com as seguintes soluções: suco de limão galego, vinagre de vinho tinto, solução de ácido cítrico a 7% (P/V) e solução de ácido acético a 4% (V/V). O tempo de contacto foi de 15 min. e, em seguida, as amostras eram homogeneizadas com 225 mL de uma solução tampão fosfato pH 7,2 e diluído até 10^{-2} . As diluições eram então plaqueadas em duplicata, em TCBS, através da técnica de espalhamento, incubadas por $37^\circ\text{C}/18$ h e contadas através do teste de CPP. O controle era semelhante ao usado no experimento da segunda fase.

Análise estatística

A variável Número de Unidades Formadoras de Colônia, representada por UFC/g foi submetida a transformação logarítmica, tendo em vista a grande dispersão dos valores obtidos, antes de se aplicar o teste da Análise de Variância, ao nível de $\alpha = 0,05$, considerando-se cinco repetições da variável para as 10 concentrações utilizadas, separadamente para os ácidos acético e cítrico. Deve-se ressaltar que apenas a segunda fase dos experimentos foi considerada adequada para se proceder a essa análise. Tendo em

vista a possibilidade de haver influência significativa da concentração das soluções aquosas sobre o grau de contaminação do camarão por *V. cholerae*, foi também aplicado o Teste de Tukey, que tem a capacidade de discriminar quais concentrações diferem entre si com significância estatística, também ao nível de $\alpha = 0,05$ (Centeno, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos ao log do número de UFC/ mL de *V.cholerae* após o contato direto com soluções de ácido acético e ácido cítrico, nas diferentes concentrações usadas, foram sempre <1 enquanto que, para o controle (água estéril + cultura) variaram de log de 5,46 a log 5,69 UFC/ mL. A inativação da bactéria já era esperada, uma vez que nessas concentrações o pH médio apresentou valores de 3,20 e 2,30 para os ácidos cítrico e acético, respectivamente, e as cepas do vibrião colérico são muito sensíveis a pH ácido (Organização Pan Americana de Saúde, 1993).

Os resultados dos primeiros experimentos concordam com os encontrados por D'Aquino & Teves (1994), que testaram a eficiência do suco de limão diluído de 1/10 a 1/100 contra cepas puras de *V. cholerae* em água, e sempre houve inibição do vibrião pelo ácido cítrico contido no limão.

O mesmo não aconteceu quando cepas da bactéria contaminavam amostras de camarão. A Tabela I mostra que a redução no número de células de *V. cholerae* contaminante de camarão, em contato com soluções dos ácidos acético e cítrico, é diretamente proporcional às concentrações usadas dos ácidos. Uboldi Eiroa & Porto (1995 e 1996) utilizaram diluições de vinagre de vinho tinto (2%, 4% e 6%) equivalentes a 0,08%, 0,16% e 0,24% de ácido acético frente a cepas de *V.cholerae* contaminantes de folhas de alface e observaram que, mesmo na maior concentração usada de ácido acético (0,24%), ainda era possível recuperar cepas viáveis da bactéria. As diluições aquosas de ácido acético e cítrico, que haviam sido efetivas na inativação de células puras de *V. cholerae*, mostraram-se incapazes de eliminar essa bactéria quando atuando na qualidade de contaminantes de camarão (Figura 1).

Sousa (1999) observou o mesmo resultado quando trabalhou com *V. cholerae* em soluções aquosas de cloro e, posteriormente, com a bactéria contaminando camarão. À imitação do presente experimento, as bactérias puras foram eliminadas quando em contato com a solução aquosa de cloro, o mesmo não acontecendo quando o *Vibrio* contaminava o crustáceo. Esse resultado pode levantar a suspeita de que exista um fator de interferência.

A Tabela II mostra que cepas de *V. cholerae* O1 contaminantes de camarão, quando expostas a suco

de limão puro, vinagre de vinho tinto, solução de ácido acético a 4% (V/V) e solução de ácido cítrico a 7% (P/V), não são efetivamente eliminadas. Nossos resultados diferem daqueles encontrados por Porto & Uboldi Eiroa (1997), que testaram suco de limão puro, vinagre de vinho tinto e vinagre de álcool em filés de merluza (*Merluccius hubbsi*) e não conseguiram recuperar nenhuma célula viável do vibrião colérico.

Watterman & Small (1998) utilizaram ácido clorídrico (HCl) para acidificar carne contaminada com *V. cholerae* e concluíram que, quando o pH era reduzido para 4,0, a bactéria não sobrevivía. Este resultado discorda daqueles obtidos na presente pesquisa, uma vez que soluções de ácido acético em concentração de 1,0% e pH de 2,86 proporcionaram a recuperação de células viáveis de *V. cholerae*. É possível que o HCl, sendo um ácido inorgânico forte, prejudique mais a célula viva do que os ácidos orgânicos acético e cítrico usados nesses experimentos. Por outro lado, *V. cholerae* produz quitinase, podendo colonizar superfícies que contenham quitina, como a carapaça do camarão e de outros crustáceos, o que os protegeria da ação de qualquer agente prejudicial à célula (Tarsi & Pruzzo, 1999).

Os trabalhos de Nalin *et al.* (1979) e Amako *et al.* (1987) mostraram, respectivamente, que a presença de quitina protege o *V. cholerae* O1 contra os efeitos do pH ácido e de baixas temperaturas. O vinagre é capaz de inibir *V. cholerae* quando utilizado diretamente sobre as cepas puras, mas perde essa eficiência quando elas estão associadas com o camarão quando revestido de sua carapaça.

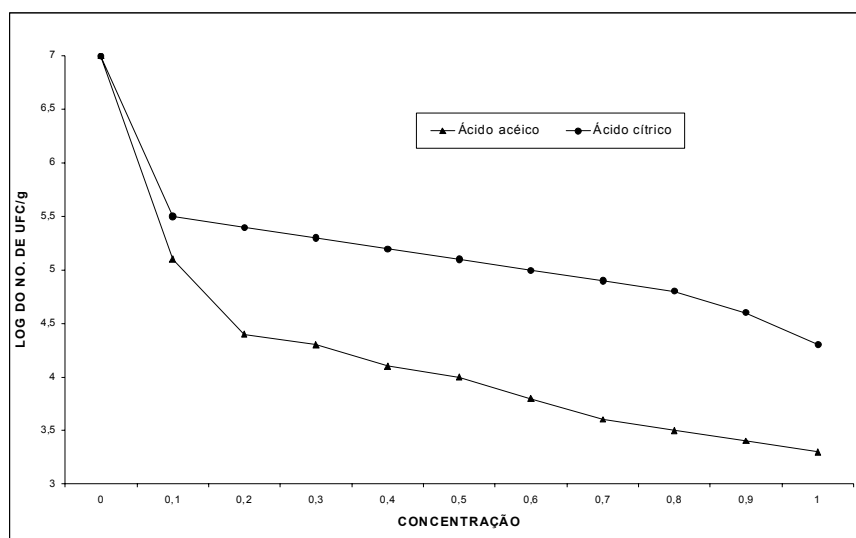
O decréscimo no número de células da bactéria é mais drástico quando se utiliza ácido acético do que ácido cítrico. Os resultados da Análise de Variância e do Teste de Tukey mostram que a utilização de 0,6% de ácido acético produz uma redução de UFC/g de

Tabela I – Logaritmo no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *V. cholerae* /g contaminante do camarão-sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, após o contato direto (15 min.) com soluções dos ácido acético e ácido cítrico, em diferentes concentrações.

Concentração de ácido acético (%)	Log do número de UFC/g Repetições				
	I	II	III	IV	V
0,1	4,74	4,67	4,45	4,38	4,53
0,2	4,72	4,46	4,38	4,32	4,43
0,3	4,60	4,38	4,15	4,05	4,41
0,4	4,49	4,12	3,85	3,93	4,26
0,5	4,43	3,76	3,66	3,82	4,10
0,6	4,38	3,53	3,59	3,63	3,92
0,7	4,01	3,20	3,42	3,49	3,85
0,8	3,88	3,11	3,34	3,43	3,71
0,9	3,84	3,08	3,26	3,40	3,67
1,0	3,64	2,95	3,11	3,27	3,54
Controle	5,74	5,57	5,43	5,36	5,51

Concentração de ácido cítrico (%)	Log do número de UFC/g Repetições				
	I	II	III	IV	V
0,1	5,51	5,62	5,50	5,49	5,48
0,2	5,38	5,58	5,30	5,41	5,43
0,3	5,33	5,54	5,25	5,31	5,33
0,4	5,32	5,51	5,24	5,27	5,29
0,5	5,05	5,45	5,15	5,24	5,18
0,6	4,86	5,31	5,03	4,99	5,01
0,7	4,83	5,24	4,93	4,85	4,91
0,8	4,72	4,99	4,85	4,72	4,76
0,9	4,57	4,81	4,51	4,69	4,58
1,0	4,49	4,62	4,41	4,23	4,28
Controle	5,60	5,63	5,60	5,56	5,53

Figura 1 – Variação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de *Vibrio cholerae* em camarão-sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, após contato com soluções de ácido acético e ácido cítrico.



V. cholerae estatisticamente semelhante quando se utiliza a concentração de 1%. Em se tratando do ácido cítrico, as reduções de UFC/g da bactéria são estatisticamente semelhantes em contato com as concentrações de 1% e 0,8%. Esses resultados nos levam a afirmar que, por razões econômicas, a melhor solução a ser utilizada é aquela com concentração de 0,6% de ácido acético.

A importância dos resultados desta pesquisa foi demonstrar que o uso de limão e vinagre em pratos de camarão e/ou saladas, uma prática comum no Brasil, apesar de terem como componentes importantes os ácidos cítrico e acético, respectivamente, não é suficiente para eliminar o *Vibrio cholerae*.

Tabela II – Logaritmo no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *V. cholerae* /g contaminante do camarão-sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, após o contato direto (15 min.) com suco de limão puro, vinagre de vinho tinto, solução de ácido acético a 4% (V/V) e solução de ácido cítrico (P/V).

Solução ácida	Log. do número de UFC/g
Suco de limão puro	2,04
Vinagre de vinho tinto	2,11
Ácido cítrico a 7%	2,44
Ácido acético a 4%	2,39
Controle	5,48

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amako, K.; Shimodori, S.; Imoto, T.; Miake, S. & Umeda, A. Effects of chitin and soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.53, n.3, p.603-605, 1987.
- Centeno, A. J. *Curso de estatística aplicada à biologia*. Centro Editorial e Gráfico /UFGO, 2ª edição, 234 p., Goiânia, 1999.
- Centro Nacional de Epidemiologia. *Bol. Epidem. on line.*, v.1, n.4, p.1-7, 1999.
- D'aquino, M. & Teves, S. A. Lemon juice as a natural biocide disinfecting drinking water. *Bull. Panam. Health Organ.*, v.28, n.4, p.324-330, 1994.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microrganisms in foods: their significance and methods of enumerations*. University of Toronto Press, 2nd edition, 1978.
- Nalin, D. R.; Daya, V.; Reid, A.; Levine, M. M. & Wu, H.C. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infec. Immun.*, v.25, p.768-770, 1979.
- Novak, S. M. Parasites associated with exotic food. *Clin. Microb. Newsl.*, v.18, n.17, p.129-133, 1996.
- Organização Pan Americana de Saúde. *Riscos de transmissão de cólera por alimentos*, 24 p., 1993.
- Pan American Health Organization. *Epidemiol. Bull.*, v.18, n.1, p.1-5, 1997.
- Pan American Health Organization. *Epidemiol. Bull.*, v.20, n.1, p.1-16, 1999.
- Porto, E. & Uboldi Eiroa, M. N. Influência de diferentes tipos de vinagre e do suco de limão Taiti na sobrevivência de *Vibrio cholerae* presente em filés de merluza. *Colet. ITAL*, v.27, n.1-2, p.1-6, 1997.
- Souza, O.V. *Efeitos do cloro sobre cultivos de Vibrio cholerae*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 57 p., Fortaleza, 1999.
- Tarsi, R. & Pruzzo, C. Role of surface proteins in *Vibrio cholerae* attachment to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, n.3, p.1348-1351, 1999.
- Uboldi Eiroa, M. N. & Porto, E. Evaluation of different chlorine based disinfectants and vinegar against *Vibrio cholerae* present in lettuce. *Colet. ITAL*, v.25, n.2, p.169-172, 1995.
- Uboldi Eiroa, M. N. & Porto, E. Influência de diferentes tipos de vinagre e do hipoclorito de sódio na sobrevivência de *Vibrio cholerae* em folhas de alface (*Lactuca sativa*) artificialmente contaminadas. *Colet. ITAL*, v.26, n.2, p.199-207, 1996.
- Vieira, R. H. S. F. *Vibrio parahaemolyticus em amostras de caudas de lagostas Panulirus laevicauda (Latreille) obtidas na feira de pescados do Mucuripe e em uma indústria de pesca de Fortaleza: determinação dos sorogrupos K e prova de Kanagawa a partir de cepas isoladas*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 115 p., São Paulo, 1990.
- Waterman, S. R. & Small, P. L. C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain food sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, n.10, p.3882-3886, 1998.